



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Perfil de peroxidación lipídica y de expresión de microRNAs como marcadores predictivos de daño neurológico en recién nacidos prematuros con episodios de hipoxia intermitente

Alumno: Inmaculada Lara Cantón

Inmaculada Lara Cantón
Digitally signed by
Inmaculada Lara Cantón
Date: 2021.08.30
21:39:01 +02'00'

Tutor: Javier González de Dios

Curso: 2020-21

Título: Perfil de peroxidación lipídica y de expresión de microRNAs como marcadores predictivos de daño neurológico en recién nacidos prematuros con episodios de hipoxia intermitente

Resumen: Los recién nacidos prematuros padecen síndrome apneico bradicárdico, una patología derivada de la inmadurez de los núcleos del tronco cerebral que regulan la dinámica respiratoria. Esto produce episodios intermitentes de hipoxia. Los rangos de saturación de oxígeno normales destinados a evitar daño neurológico por hipoxia han sido establecidos entre 90-95%. Nuestra hipótesis es que el incumplimiento de los rangos causará estrés oxidativo y aumento de expresión de microRNAs asociados a hipoxia que pueden dar lugar a daño en el sistema nervioso central y afectar al neurodesarrollo. Se incluirán prematuros estables menores de 32 semanas de edad gestacional en los que se monitorizará de forma continua la saturación de oxígeno (SpO2) y frecuencia cardíaca (FC), se analizarán los histogramas de frecuencia de saturaciones. Se compararán los que se mantengan en rango normal (grupo control) con los que estén más del 50% del tiempo fuera de rango (grupo experimental). La intensidad de la hipoxia se determinará utilizando un "score metabólico" (citolina, 6,8-hidroxipurina e hipoxantina) y marcadores de estrés oxidativo mediante HPLC-MS/MS. Además, se estudiará la expresión global de microRNAs por transcriptómica y se validarán aquellos más expresados por RT-qPCR. El neurodesarrollo se evaluará según protocolo en la consulta de Neurodesarrollo a los 24 meses.

Title: Lipid peroxidation profile and mRNA expression as predictive markers of neurological damage in preterm infants with intermittent hypoxic episodes.

Abstract: Preterm infants have an immaturity of the nuclei of the brain stem that regulate respiratory drive. As a consequence they suffer from an apneic syndrome characterized by intermittent hypoxic episodes. Normality ranges for oxygen saturation have been established between 90-95%. We hypothesize that not fulfillment of these ranges will cause both oxidative stress and increased expression of microRNA associated with hypoxia, leading to damage to the central nervous system and neurodevelopment. Preterm infants less than 32 weeks of gestational age will be included and constantly monitored for SpO2. Frequency SpO2 histograms will be retrieved daily during the study period. Preterm babies within normal ranges vs. those that remain >50% of the time out of range will be compared. The intensity of hypoxia will be measured using a "metabolic score" (citoline, 6,8-hydroxypurine, hypoxanthine) and biomarkers of oxidative stress will be measured using HPLC-MS/MS. In addition, global expression of microRNA will be assessed by transcriptomics and the higher expressed with be validated by RT-qPCR. Neurodevelopment will be assessed following our protocols at 24 months postnatal in the Follow Up Clinic.

Antecedentes y estado actual del tema

1. Síndrome apneico con hipoxia-reoxigenación de la prematuridad

La prematuridad se caracteriza por una inmadurez estructural y funcional del pulmón, que conduce a una insuficiencia respiratoria que requiere tratamiento con oxígeno y ventilación mecánica (invasiva o no). La estructura sacular pulmonar es muy sensible a estos tratamientos, dando lugar a patología pulmonar crónica, especialmente en los más prematuros (1,2). El daño pulmonar se caracteriza por la detención del crecimiento vascular y de la formación alveolar, incremento en la reactividad bronquial, disminución de la distensibilidad pulmonar, fibrosis intersticial y, a menudo, necesidad de oxigenoterapia prolongada (3,4,5). La prematuridad se asocia también con una inmadurez de los centros respiratorios bulbares y protuberanciales que responden inadecuadamente a las señales emitidas por los quimio y mecanorreceptores periféricos y que son los que regulan la función respiratoria (6,7). La combinación de todos estos factores conduce a un síndrome apneico-bradicárdico que se caracteriza por episodios intermitentes de hipoxia y bradicardia que precisan ajustar la ventilación y suplementación con oxígeno para normalizar la saturación de oxígeno y evitar así tanto daño por hipoxia como por hiperoxia.

2. Rangos de normalidad de la saturación del oxígeno arterial medidos por pulsioximetría

El mantenimiento de los prematuros dentro de los rangos de SpO₂ recomendados para evitar que permanezcan un tiempo excesivo en hipoxia o hiperoxia requiere de una vigilancia continuada (8). Los rangos de SpO₂ recomendados para minimizar las secuelas de la hipoxia/hiperoxia han sido actualizados, debiendo mantenerse entre 90-95% (9). Los estudios en prematuros indican que las desaturaciones (SpO₂ <85%), son muy frecuentes (>50 episodios por día), pueden tener una duración de >3 minutos y, a menudo, se acompañan de bradicardia (FC <100 latidos por minuto). Los tratamientos más eficaces en la apnea de la prematuridad son la presión positiva continua nasal (CPAPn) y el de citrato de cafeína (10,11). Sin embargo, hay un porcentaje de prematuros extremos (<32 semanas de edad gestacional) que no responden adecuadamente a la cafeína y padecen episodios frecuentes de hipoxia y bradicardia, por lo que tienen que ser suplementados con oxígeno de forma intermitente para su estabilización (12). Sin embargo, la suplementación con oxígeno puede causar a menudo hiperoxia (SpO₂ >95%) durante varios minutos que precisa nuevos ajustes de la fracción inspiratoria de oxígeno (FiO₂) (13).

La monitorización de la SpO₂ y la FC se realiza por pulsioximetría continua durante el ingreso de los pacientes prematuros. Los pulsioxímetros actuales permiten un registro continuo de SpO₂ y FC y su almacenamiento, con la posibilidad de descargar los datos y generar histogramas de frecuencia de rangos establecidos, para así evaluar el tiempo que el paciente ha permanecido dentro y fuera de rango. Estudios previos han mostrado que los prematuros tienden a estar fuera de rango una parte importante del tiempo a pesar de que el personal de enfermería corrija las desviaciones de SpO₂ mediante el ajuste de FiO₂. Un estudio de Hagadorn et al., ha demostrado que en UCI neonatales de referencia los pacientes prematuros sólo estaban dentro de los rangos establecidos entre un 16% y un 64% del tiempo mientras que estaban por encima del rango establecido entre un 20% y un 73% del tiempo (14). Otros estudios han mostrado hallazgos similares en cuanto a la

dificultad que entraña el mantenimiento de los rangos de saturación pretendidos en prematuros con oscilaciones de saturación (15,16).

3. Oscilaciones de la saturación de oxígeno y pronóstico clínico

Las oscilaciones entre estados de hipoxia e hiperoxia intermitentes son responsables de patologías asociadas a la generación de radicales libres del oxígeno en el paciente prematuro. Estudios realizados en modelos experimentales demostraron que ratones recién nacidos sometidos a ciclos intermitentes de hipoxia/hiperoxia padecían lesiones vasculares retinianas más importantes que cuando eran sometidos alternativamente a períodos más prolongados de hipoxia/hiperoxia (17). Los hallazgos experimentales han tenido confirmación en estudios clínicos en los que se ha podido demostrar que las oscilaciones de hipoxia/hiperoxia en neonatos prematuros no solo favorecen la aparición de retinopatía de la prematuridad (18) sino también de otras patologías graves asociadas a estrés oxidativo (19) con graves consecuencias a largo plazo. En un reciente estudio aleatorizado se revisaron post-hoc los resultados clínicos de prematuros y se estableció una asociación entre el número de episodios de desaturación y/o bradicardia de una duración mayor de 1 minuto y la mortalidad y/o discapacidad neurosensorial (20).

4. Evaluación de la intensidad de la hipoxia: marcadores específicos

La hipoxia en la clínica se evalúa mediante la determinación del valor del pH, pO₂, el déficit de bases y la concentración de lactato. En situación de anaerobiosis, el piruvato se transforma en lactato y la concentración del mismo se utiliza como marcador de la intensidad de la hipoxia. Sin embargo, la concentración de lactato se normaliza rápidamente con las medidas terapéuticas habituales, de manera que no refleja la intensidad ni duración del tiempo de hipoxia (21). El Grupo de Investigación en Perinatología junto con el Dr. Saugstad ha estudiado marcadores tisulares y plasmáticos en un modelo de cerdo sometido a hipoxia y reoxigenación utilizando metabolómica no dirigida. Los resultados mostraron que los metabolitos que correlacionaban mejor con la intensidad y la duración de la hipoxia eran citicolina, 6,8-dihidroxipurina e hipoxantina (22,23,24). Basándonos en estos resultados, se han estudiado los precursores de citicolina a nivel plasmático (25) y, por otro lado, se ha validado experimentalmente el “score metabólico” constituido por estas tres moléculas. Los resultados muestran un valor predictivo similar al lactato para las situaciones agudas, pero mantienen un valor predictivo superior pasadas unas horas de la reoxigenación. Nuestra hipótesis es que el “score metabólico” refleja la hipoxia tisular mejor que el lactato y, por lo tanto, tiene una mayor capacidad de predicción de daño tisular especialmente en tejidos tan sensibles a la hipoxia como es el SNC (26).

5. Oxigenoterapia, estrés oxidativo y prematuridad

Las situaciones de hipoxia-reoxigenación favorecen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causarán estrés oxidativo y alteraciones del estado redox. Las ERO reaccionan de forma inmediata con proteínas, DNA, lípidos o carbohidratos causando daño estructural y funcional que, si es muy intenso, puede llegar a generar patología directa o mediante la activación vías pro-inflamatorias o pro-apoptóticas (27). La prematuridad conlleva una inmadurez del sistema antioxidante que provoca una gran susceptibilidad ante situaciones de agresión oxidativa (28). Así, en estudios de nuestro grupo hemos podido

constatar la presencia de incrementos significativos de estrés oxidativo (cociente GSH/GSSG) y de marcadores de daño oxidativo a proteínas (cociente orto-tirosina/fenilalanina), a lípidos (F2-isoprostanos e isofuranos) y a ADN (cociente 8-hidroxi-2´desoxiguanosina/deoxiguanosina) en prematuros que recibieron una carga de oxígeno elevada durante la estabilización postnatal (29). Estos resultados han sido corroborados por otros autores en estudios similares (30,31).

6. Biomarcadores de estrés oxidativo validados

El Grupo de Investigación en Perinatología ha validado marcadores de estrés oxidativo utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida o de gases (HPLC-MS/MS) en distintos biofluidos (plasma, sangre total, suero, orina, líquido amniótico) como son metabolitos derivados de la oxidación de proteínas circulantes (orto-tirosina/fenilalanina; meta-tirosina/fenilalanina), de ADN (8-hidroxi-2´desoxiguanosina/deoxiguanosina), de peroxidación de lípidos de membranas celulares como el ácido araquidónico (isoprostanos e isofuranos), el ácido docosahexanoico (neuroprostanos y neurofuranos) o el ácido adrénico (sustancia blanca) que está en proceso de validación para plasma (32,33,34,35,36). En prematuros moderados y extremos (≤ 32 semanas de edad gestacional) sin patología perinatal asociada a estrés oxidativo, hemos establecido rangos de normalidad para isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos y neurofuranos en las primeras 4 semanas de vida postnatal (37). Estos últimos biomarcadores resultan específicos para la determinación de daño neurológico ya que los derivados oxidados del ácido docosahexanoico y el ácido adrénico reflejan fielmente la oxidación de componentes lipídicos altamente concentrados en la sustancia gris y blanca del SNC (37).

7. Alteraciones de la oxigenación y microRNAs

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificantes endógenas cortas (18-22 nucleótidos) monocatenarias que ejercen un papel clave en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los microRNAs se unen generalmente a la región no traducida en 3' de los RNAs mensajeros (mRNAs) de genes diana y bloquean su expresión a través de tres mecanismos distintos: corte y degradación del mRNA, represión de la traducción o secuestro de los mRNAs en cuerpos P, donde no pueden ser traducidos (38,39). Los microRNAs parecen influir en diversos estadios de la neurogénesis que incluyen diferenciación celular, proliferación y sinaptogénesis tanto en estudios in vivo como in vitro (40,41,42,43). Los estudios en ratones y humanos han mostrado que aproximadamente el 70% de los microRNAs identificados se expresan en el tejido cerebral en relación con la complejidad del SNC y sus conexiones. Así, Let7b y miR-21 juegan un papel relevante en la patología post-traumática del animal adulto, isquemia/infarto y en la enfermedad de Alzheimer. Recientemente se ha podido demostrar que miR-29b, un

microRNA que se activa durante la maduración neuronal, juega un papel relevante en la inhibición de la apoptosis neuronal. A su vez se ha podido demostrar que miR-124 influye en el desarrollo del SNC, la neurodegeneración, situaciones de estrés, infarto, neuroinmunidad y tumores cerebrales. También es predictor del resultado final neurológico en el infarto de miocardio. miR-155 está implicado en la respuesta inmune mediada por la microglia, y recientemente se han identificado miR-374a y miR-210 como reguladores importantes en la hipoxia isquemia con afectación neurológica en un modelo de hipoxia reoxigenación en cerdos recién nacidos (44,45,46,47).

Sin embargo, existe todavía escasa experiencia tanto clínica como experimental para dilucidar cuál es el papel fisiológico y fisiopatológico de los microRNAs en el recién nacido. Dada la situación de rápido desarrollo cerebral en el período postnatal, debe haber un patrón de expresión de microRNAs característico de este período, que podría estar alterado en respuesta a cambios en la saturación de oxígeno y afectar al desarrollo ulterior del SNC. Sería por lo tanto uno de los objetivos primordiales de nuestro estudio determinar la expresión de microRNA por RNA sequencing y validación posterior por RTq-PCR aquellos más expresados y que tuviesen relación con patología o protección del SNC en el prematuro causadas por cambios de la concentración de oxígeno.

- 1) Baraldi E et al. *Early Hum Dev* 2009;85(10 Suppl):S1–3.
- (2) Hjalmarson O, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:83–7.
- (3) Pramana IA et al. *Eur J Med Res* 2011;16:223–30.
- (4) Hennessy EM et al. *Arch Dis Child* 2008;93:1037–43.
- (5) Fawke J et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:237–45.
- (6) Martin RJ et al. *Clin Perinatol*. 2015;42:825-38.
- (7) Bates ML et al. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;189:329-37.
- (8) Abu-Shaweesh JM et al. *Pediatr Pulmonol* 2008;43:937–44.
- (9) Askie L et al. *Cochrane Database Syst Rev* 2017 Apr 11;4:CD011190.
- (10) Atik A et al *Neurotoxicology* 2017;58:94-102.
- (11) Poets CF. *Acta Paediatr* 2010;99:172-77.
- (12) Di Fiore JM et al. *J Pediatr* 2010;157:69-73.
- (12) Baerts W et al. *Neonatology* 2011;99:65-72.
- (13) van Zanten HA et al. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2014;99:F269-73.
- (14) Hagadorn JI et al. *Pediatrics* 2006;118:1574-82.
- (15) Lakshminrusimha S et al. *J Perinatol* 2015;35:8-15.
- (16) Clucas L et al. *Pediatrics* 2007;119:1056-60.
- (17) Winners-Mendizabal OG et al. *J Neonatal Perinatal Med* 2014;7:113-7.
- (18) Di Fiore JM et al. *Pediatr Res* 2012;72:606-12.
- (19) Vento M. *Neonatology* 2014;105:323-31.
- (20) Poets CF et al. *JAMA* 2015;314:595-603.
- (21) Saugstad O, *Acta Paediatr*. 2002;91:17–19.
- (22) Arduini A et al. *Pediatr. Res*. 2014;76:127–134.
- (23) Solberg R et al. *Plos One* 2013;8:e66540.
- (24) Kuligowski J et al. *Redox Biol* 2017;12:1-7.
- (25) Solberg, R. et al. *Ped Res* 2016;80, 284–292.
- (26) Sánchez-Illana, Á. et al. *Sci Rep* 2017;7:40315.
- (27) Torres-Cuevas I et al. *Redox Biol* 2017;12:674-681.
- (28) Vento M et al. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2945-55.

- (29) Vento M et al. *Pediatrics* 2009;124:e439-49.
- (30) Ezaki S et al. *J Clin Biochem Nutr* 2009;44:1118.
- (31) Kapadia VS et al. *Pediatrics* 2013;132:e1488-96.
- (32) Cháfer-Pericás C et al. *Talanta* 2016;153:152-7.
- (33) Torres-Cuevas I et al. *Anal Chim Acta* 2016;913:104-110.
- (34) Escobar J et al. *J Pharm Biomed Anal* 2016;123:104-12.
- (35) Cháfer-Pericás C et al. *Data Brief* 2015;5:1026-30.
- (36) Cháfer-Pericás C et al. *Anal Chim Acta* 2015;886:214-220.
- (37) Kuligowski J et al. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:178-84.
- (38) Bartel DP. *Cell* 2009;136:215–33.
- (39) Huntzinger E et al. *Nat Rev Genet* 2011;12:99–110.
- (40) Motti D et al. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:347–52.
- (41) Cao X et al. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:77–103.
- (42) Sun Y et al. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 193.
- (43) Sepramaniam S et al. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 1418–1432.
- (44) Gilje P et al. *Crit Care* 2014; 18:R40.
- (45) Ma Q et al. *Neurobiol Dis* 2016;89:202-212.
- (46) Looney AM et al. *J Pediatr* 2015;167:269-73
- (47) Garberg HT et al. *Neonatology* 2017;111:133-39.

Hipótesis

Los episodios de hipoxia intermitente y la reoxigenación en los prematuros de edad gestacional menor de < 32 semanas en el contexto del síndrome apneico de la prematuridad, mantienen al paciente fuera del rango de saturación de oxígeno recomendado durante un tiempo significativo, lo que ocasionará estrés/daño oxidativo y la expresión de un patrón de microRNAs asociados a la hipoxia intermitente.

Objetivo principal

- Determinar el porcentaje de tiempo que permanecen fuera del rango recomendado de saturación de oxígeno (SpO₂) prematuros menores 32 semanas de edad gestacional con síndrome apneico y episodios de hipoxia intermitente durante un período de 7 días.

Objetivos secundarios

- 1) Determinar los marcadores de estrés/daño oxidativo y de inflamación en orina mediante métodos validados de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem que incluyen: F₂-isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos, neurofuranos y dihomoisoprostanos, 3-cloro-tirosina y nitro-tirosina.
- 2) Determinar el “score metabólico” indicativo de la intensidad y duración acumulativa de la hipoxia tisular mediante la determinación en plasma del combinado de metabolitos: hipoxantina, colina y 6,8-dihidroxipurina.
- 3) Determinar el patrón de expresión de microRNAs en plasma mediante secuenciación de RNA (RNA-seq) y validar aquellos más expresados que se asocian a la hipoxia intermitente mediante RT-qPCR.
- 4) Evaluar el desarrollo neurocognitivo y sensorial a los 24 meses de edad gestacional corregida mediante escalas validadas (Bayley III, ASQ-3) en la consulta de Neurodesarrollo. Determinar presencia de daño oftalmológico o auditivo.

5) Establecer correlaciones estadísticas entre los hallazgos clínicos, bioquímicos, genéticos y del neurodesarrollo.

Material y métodos

Diseño

Estudio observacional y prospectivo realizado en una cohorte de prematuros en una Unidad de Neonatología IIIb de referencia regional. Se incluirán prematuros con edad gestacional inferior a 32 semanas diagnosticados de síndrome apneico-bradicárdico. Durante el tiempo de estudio, los pacientes incluidos serán monitorizados de forma continuada durante 7 días con un pulsioxímetro adicional colocado a nivel postductal. Se registrarán variables y parámetros clínicos y de soporte respiratorio. Se obtendrán muestras de plasma y orina al inicio y final del estudio en el que se determinarán marcadores de estrés oxidativo en orina y de hipoxia en plasma.

Tras los 7 días de monitorización, se clasificará a los pacientes en dos grupos, según el tiempo transcurrido en el rango de SpO₂ objetivo (90-95%). Se compararán los pacientes que estén fuera del rango de saturación durante más tiempo (grupo experimental) y los que se mantengan dentro del rango establecido durante menos tiempo (grupo control). También se analizarán diferencias entre los pacientes con oxígeno de forma continua y los que lo recibieron de forma intermitente.

A los 24 meses de edad gestacional corregida se realizará la evaluación del neurodesarrollo a los pacientes mediante test de Bayley III o ASQ3. Una vez concluido el estudio se realizará un estudio comparativo estadístico entre ambos grupos.

Participantes

La población del estudio estará formada por prematuros ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia que cumplan todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, durante un período de reclutamiento de 24 meses. Se informará a los padres sobre el estudio y se les proporcionará la hoja de información y el consentimiento informado.

Criterios de inclusión

1. Edad gestacional menor de 32 semanas, a partir del 5^o-7^o día de vida
2. Presentar síndrome apneico-bradicárdico
3. Iniciada alimentación enteral parcial o completa e iniciada recuperación del peso al nacimiento
4. Estabilidad respiratoria con o sin soporte respiratorio no invasivo

Criterios de exclusión

1. Intubación con soporte respiratorio invasivo
2. Cromosopatías, cardiopatías o malformaciones congénitas severas
3. Ductus arterioso persistente hemodinámicamente significativo
4. Patología que requiera cirugía en el momento del inicio de la monitorización
5. Hemorragia intraventricular grado III o hemorragia parenquimatosa cerebral
6. Convulsiones
7. Rechazo de los padres a participar en el estudio.

Cálculo muestral

Se considera que el 50% de los pacientes con síndrome apneico bradicárdico pueden estar sometidos a hipoxia intermitente. Considerando que el riesgo en pacientes no expuestos sería menor del 10%, con un intervalo de confianza al 95% y una potencia al 90%, se necesitarían 52 pacientes en cada cohorte, 104 en total (Epidat 4.2).

Al tratarse de un estudio observacional hemos realizado el cálculo de la capacidad de reclutamiento durante un período de 24 meses. La casuística de nuestro centro revisada indica que nacen alrededor de 90 recién nacidos prematuros con estas características por año, por lo que asumiendo un 30% de pérdidas, se conseguiría un reclutamiento suficiente en el período de estudio.

Métodos estadísticos

Se realizarán métodos estadísticos estándar para todas las variables estudiadas. Se analizará si la muestra presenta una distribución normal o no normal de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Si la muestra presenta una distribución normal se analizarán las variables cuantitativas mediante el test T de Student y las cualitativas mediante Chi-cuadrado. Las muestras de distribución no normal se analizarán mediante estadísticos no paramétricos, con Mann Whitney para variables continuas y Kruskal Wallis para las variables cualitativas. Se desarrollará un modelo predictivo usando una regresión logística para llevar a cabo la selección de las variables relacionadas con la discriminación entre grupos y un análisis multivariante para establecer un algoritmo que defina las variables más predictivas. Se establecerán correlaciones lineales de Pearson para determinar la asociación entre las variables analíticas y la evaluación neurológica. Los análisis estadísticos se llevarán a cabo mediante el software SPSS.

Métodos clínicos

1) Se redactará un registro electrónico de datos (RED) similar al de historia clínica habitual en el que además se incluirán apartados propios de la investigación como: análisis de datos de pulsioximetría, analítica experimental y datos del seguimiento. El RED será actualizado por los investigadores colaboradores hasta la finalización del estudio de cada paciente.

2) En los pacientes reclutados, se monitorizará mediante pulsioximetría postductal con un sensor extra, según el protocolo del Servicio de Neonatología. Se descargarán los datos a formato .csv cada 72 horas y se determinará el tiempo dentro de rango de SpO₂ (90-95%) y fuera del mismo (Cochrane Database Syst Rev 2017).

3) Variables clínicas: edad gestacional, edad postnatal en el momento del reclutamiento, somatometría, necesidad de oxígeno suplementario, soporte respiratorio, complicaciones agudas o eventos durante el período de estudio.

Biomarcadores de peroxidación lipídica en orina

Al inicio del estudio (tiempo 1) y tras la finalización del período de estudio (tiempo 2) se recogerán 600 µL de orina mediante la colocación de un disco de algodón en el pañal que se exprime para extraer la orina, que se congela inmediatamente a -80°C hasta su procesado. En una segunda fase las muestras se descongelan, purifican y preconcentran mediante extracción en fase sólida. En los extractos recuperados se determinan F2-isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos, neurofuranos, dihomio-isoprostanos y dihomio-isofuranos empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Los métodos utilizados se han desarrollado, validado y publicado.

Obtención de plasma

Se harán determinaciones al inicio (tiempo 1) y al final del estudio (tiempo 2). Para determinar el “score metabólico” y el patrón de microRNAs expresado se utilizará sangre venosa periférica en un tubo EDTA (MiniCollect Tube K3E) que contiene el ácido etilendiamino-tetra-acético como anticoagulante. El volumen a extraer será de 0.6 mL de sangre aprovechando extracciones solicitadas por otros motivos, y se centrifugarán inmediatamente a 1500 G durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. Dado el hematocrito de estos pacientes se obtendrán aproximadamente unos 200-300 µL de plasma. Una alícuota de 50 µL del plasma se utilizará para la determinación del score metabólico y una alícuota de 200 µL para la determinación de microRNAs. Las alícuotas adecuadamente etiquetadas serán ultracongeladas a -80°C hasta su análisis. El plasma sobrante también se conservará a -80°C para realizar las determinaciones ulteriores que fueran precisas.

Biomarcadores de hipoxia (“score metabólico”) en plasma

Para realizar el análisis, el plasma se descongela en hielo y se procesa para determinar un panel de metabolitos característicos que configuran el denominado score metabólico. Los metabolitos a determinar son hipoxantina, colina y 6,8-dihidroxi-purina empleando HPLC-MS/MS. La utilidad de este panel de biomarcadores se ha demostrado previamente en trabajos publicados por nuestro grupo [4, 5]. Los métodos utilizados se desarrollaron y validaron siguiendo las recomendaciones de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).[4] Kuligowski J et al. Redox Biol. 12 (2017) 1-7. [5] Sánchez-Illana A et al. Sci Rep. 7 (2017) 40315.

Determinación de los microRNAs circulantes

Se utilizarán 200 µL de plasma descongelado, se extraerá el RNA evaluando su cantidad y calidad y se procederá a su análisis por RNA-seq. La extracción y cuantificación de microRNAs se determinará siguiendo las instrucciones del kit miRNeasy Serum/plasma kit (217184) de QIAGEN mientras que el análisis de los niveles de expresión alterados de los diferentes microRNAs se evaluará mediante la plataforma de Illumina-Solexa Sequencer. Por último, se cuantificarán y validarán los microRNAs pertinentes mediante RT-qPCR (miScript II RT kit, miScript SUBR Green PCR kit, miScript PCR Controls y miScript Primer Assays).

Plan de trabajo

Parte Clínica

Se realizará en el Servicio de Neonatología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Se trata de un centro de referencia regional grado IIIb, máximo nivel asistencial según la clasificación de la Sociedad Española de Neonatología. El hospital atiende >5000 partos/año y recibe las gestaciones de alto riesgo de toda la provincia de Valencia y de alto riesgo para ciertas especialidades quirúrgicas de la Comunidad Valenciana y de las comunidades colindantes.

Parte analítica

Las muestras serán procesadas en nuestro Laboratorio del Grupo de Investigación en Perinatología (preparación de las muestras) y nuestros investigadores utilizarán conjuntamente con los técnicos las instalaciones de las plataformas de Genómica y de Metabólica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia).

Cronograma

Meses 0-3: preparación del estudio y puesta a punto de los métodos analíticos

- 1) Desarrollo final del "Protocolo" completo del estudio.
- 2) Redacción del "Manual del Investigador".
- 3) Redacción de la "Hoja electrónica de registro de datos clínicos y de laboratorio".
- 4) Entrenamiento del personal de enfermería en almacenamiento, descarga y valoración de los registros de pulsioximetría.
- 5) Envío de la documentación completa según los requerimientos al Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC; Hospital Universitario y Politécnico La Fe).
- 6) Puesta a punto de las técnicas de HPLC-MS/MS con los investigadores del grupo.
- 7) Puesta a punto de las técnicas de determinación y evaluación de microRNAs con los técnicos de las plataformas ómicas del IIS La Fe (0-6 meses).

Meses 4-32: reclutamiento de los pacientes y análisis biológico de las muestras

- 1) Identificación y reclutamiento de los pacientes.
- 2) Recogida de los datos clínicos.
- 3) Obtención y almacenamiento de las muestras biológicas.
- 4) Procesado de muestras biológicas mediante UPLC-MS/MS, RNAseq y RT-qPCR cada 3 meses.
- 5) Publicación y difusión en congresos de la metodología de laboratorio utilizada.
- 6) Análisis intermedio de las variables clínicas, publicación y presentación a la comunidad investigadora.

Meses 22-36: neurodesarrollo, análisis estadístico de las muestras y difusión de los resultados

- 1) Revisión de los pacientes en la Consulta de Neurodesarrollo.
- 2) Se completa el procesado de todas las muestras biológicas pendientes.
- 3) Análisis estadístico de las variables clínicas, analíticas y neurocognitivas y su correlación.
- 4) Publicaciones y presentaciones en reuniones científicas

Comentarios del proyecto

Relevancia de la propuesta

Los prematuros menores de 32 semanas de edad gestacional suponen entre el 3-5% de los nacimientos, entre 12-15000 pacientes al año en España. Entre el 80-90% de estos pacientes presentan síndrome apneico-bradicárdico, con episodios de hipoxia y bradicardia, precisando tratamiento con soporte respiratorio o citrato de cafeína. En estos pacientes, el pulsioxímetro suena una media de 50 veces al día, con necesidad de aumentar la FiO₂. Estudios previos han demostrado que estos pacientes pueden estar hasta el 50% del tiempo fuera del rango recomendado de SpO₂.

Si se confirma la hipótesis del estudio, el proceso de hipoxia-reoxigenación reiterado causará estrés oxidativo, sobre-expresión de microRNA asociados a hipoxia y finalmente daño al sistema nervioso central (SNC). Clásicamente, se atribuía el daño al SNC principalmente al período agudo inmediato al nacimiento. Si confirmásemos nuestra hipótesis y se pudiese disponer de marcadores precoces se podría valorar la implementación de sistemas de "loop" de control de oxigenación automática, que podrían disminuir el tiempo fuera de rango de SpO₂ y la patología asociada. En colaboración con investigadores de CWRU (Dr. RJ Martin, Cleveland; USA) que estudian aspectos de regulación respiratoria se tendría un enfoque multifocal para evaluar la eficacia y seguridad de los sistemas de oxigenación automático.

Limitaciones del estudio

Las posibles limitaciones son la falta de reclutamiento, falta de obtención de muestras de sangre u orina o pérdidas en el seguimiento del paciente para la valoración del neurodesarrollo.

En relación a la falta de reclutamiento, el Hospital La Fe tiene unos 5000 partos al año, con unos 90 pacientes al año menores de 32 semanas de edad gestacional, por lo que el reclutamiento podría ser completado. Además, el grupo tiene una amplia experiencia en reclutamiento para estudios clínicos. En lo referente a la falta de obtención de muestras, las técnicas analíticas permitirán el análisis de plasma con volúmenes muy pequeños. Además, el método de recogida de orina mediante algodón para su obtención ha sido utilizado y validado en estudios previos. La variabilidad analítica o la dificultad en la interpretación de los resultados es un hecho inherente a este tipo de estudios que no es posible predecir.

Sobre el neurodesarrollo, el estudio se completará con la evaluación a los 24 meses de los pacientes, lo que prolongará el tiempo del estudio pero no necesariamente la duración de la ayuda económica de investigación.

Características del equipo

El Grupo de Investigación en Perinatología se trata de un equipo multidisciplinar que abarca todos los aspectos relacionados con el estudio. La parte clínica está a cargo de neonatólogos con amplia experiencia clínica y en estudios previos de similares características. Se encargarán de identificar a los pacientes, supervisar los controles y registro de datos, y almacenarlos en el registro electrónico. Asimismo, ayudados por el personal de enfermería, recogerán las muestras biológicas, las procesarán y almacenarán hasta su análisis posterior. El equipo de laboratorio está constituido por farmacólogo con experiencia en investigación, químicos pre y postdoctorales, un bioquímico, y un biólogo con experiencia en cromatografía acoplada a espectrometría de masas y determinaciones genéticas. Contamos asimismo con la asesoría de la plataforma de genética, metabolómica,

bioinformática y estadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe que complementan el trabajo de nuestro equipo.

Experiencia del equipo investigador sobre el tema

El Grupo de investigación en Perinatología (GIP) ha desarrollado en los últimos 20 años estudios relativos a la oxigenación del recién nacido en la transición fetal neonatal y en la estabilización posterior. Desde 2005 ha recibido financiación competitiva pública nacional por medio de 7 proyectos, ensayos clínicos multicéntricos nacionales, y financiación internacional (NIH USA, LAERDAL Norway, GERBER FOUNDATION USA, THRASHER FOUNDATION USA, Miller School of Medicine USA, NHMRC Australia) para estudios relacionados con el metabolismo del oxígeno y su toxicidad en el período perinatal para estudios clínicos y experimentales.

Fruto de esta investigación han sido contribuciones a guías clínicas internacionales como:

- 1) Guías de reanimación del recién nacido a término asfixiado (Circulation 2010)
- 2) Guías de reanimación del recién nacido prematuros (Pediatrics 2015)
- 3) Confección nomograma de saturación de oxígeno en recién nacidos a término y pretérmino para ayudar al reanimador a suplementar el oxígeno de forma individualizada (Pediatrics 2010; Arch Dis Child Fetal Neonatal 2010)
- 4) Protocolos de suplementación y "oxygen tracking system" (J Pediatr 2011)
- 5) Estrategias para evitar patología pulmonar crónica (Pediatrics 2008; 2009; J Pediatr 2014; Antioxid Redox Signal 2015; Neonatology 2017; Cochrane Review 2017).

El GIP ha desarrollado y validado marcadores de daño oxidativo para la valoración del estrés oxidativo en el período neonatal mediante la utilización de metabolómica dirigida y no dirigida. Estos marcadores están siendo utilizados por numerosos grupos de investigación básica y clínica a nivel internacional. El GIP ha desarrollado conjuntamente con otros grupos modelos experimentales de transición fetal neonatal y de adaptación postnatal en ratones y cerdos cuyo resultado ha servido para validar marcadores, modificar estrategias clínicas, estudios de daño selectivo y ensayo de drogas. El grupo asociado del Prof. Saugstad ha hecho un primer estudio con micro-RNA (Garberg HT et al Neonatology 2017). Nuestro grupo ha publicado un artículo en el que se ha validado un score metabólico cuyo fundamento reside en la utilización de sustratos metabólicos secuenciales durante la asfixia prolongada que reflejan de modo más preciso el tiempo y la intensidad de la hipoxia en un organismo (Kuligowski J et al Redox Biol 2017; Sánchez-Illana A et al Sci Rep 2017)

El IP del GIP ha actuado como investigador externo en la confección de los rangos de normalidad de saturación de oxígeno para prematuros que se ha publicado como revisión sistemática Cochrane sentando las bases para la atención clínica de los pretérmino a nivel global (Askie LM et al Cochrane Database Syst Rev 2017 Apr 11;4:CD011190.doi: 10.1002/14651858.CD011190.pub2)

El GIP ha realizado estudios sobre metilación del ADN y estrés oxidativo dependiendo de la carga de oxígeno en la transición fetal neonatal. Se han podido constatar diferencias importantes en los patrones de metilación de prematuros según la carga de oxígeno recibida durante su estabilización postnatal (Lorente-Pozo, J Pediatr. 2018).

El presente estudio tiene como objetivo principal evaluar la repercusión de las crisis de hipoxia intermitente del prematuro a nivel del SNC. Nuestra hipótesis se basa en estudios experimentales y clínicos en los que se ha visto que la hipoxia intermitente causa un importante estrés oxidativo con incremento sustancial de biomarcadores de peroxidación

lipídica relativos al SNC como neuroprostanos y neurofuranos. Además, se pretende validar el score metabólico en situaciones de hipoxia intermitente como método más efectivo de correlacionar el grado de hipoxia con los outcomes clínicos, neurodesarrollo, neurofisiología e imagen y, finalmente, identificar los microRNA que se asocian a hipoxia y daño al SNC como futuros marcadores en situaciones clínicas.

Es muy importante señalar que se va a realizar en paralelo a un estudio clínico financiado por el NHLBI (NIH) para el estudio de la repercusión en la vía aérea de la hipoxia intermitente del prematuro (Prof. RJ Martin; Case Western Reserve; Cleveland; USA) y en el que nuestro grupo también va a centralizar las determinaciones de laboratorio metabólicas y microRNA.

1. La prematuridad constituye en el momento actual uno de los problemas más relevantes del área de salud materno infantil y del desarrollo como se deduce de los estudios realizados por la Red SAMID. El IP de este proyecto ha realizado estudios conjuntos de bases de datos perinatales en el contexto del grupo iNEO financiado por el Instituto de Salud de Canadá (Canada Health Research Council) y se han publicado una serie de artículos en los que se demuestra epidemiológicamente que la prematuridad va en aumento en las últimas décadas, y que la supervivencia de los prematuros más extremos (<32 semanas de gestación) también aumenta, pero las secuelas no han disminuido.

El objetivo actual de la neonatología ha variado en el sentido de buscar la supervivencia íntegra del prematuro extremo ya que a pesar de los avances recientes existe todavía un porcentaje elevado de estos pacientes que llegan a la edad escolar con déficit en su desarrollo neurocognitivo y sensorial.

Por lo tanto, nuestro proyecto se enmarca dentro de la línea global de disminuir la morbilidad del prematuro con consecuencias a largo plazo. Para ello pretendemos: (i) identificar situaciones de riesgo potenciales para el SNC como es la hipoxia intermitente del prematuro; (ii) desarrollar de marcadores precoces predictivos como score metabólico y microRNA; (iii), establecer estrategias de prevención mediante la utilización de sistemas más adecuados de monitorización y terapia de la hipoxia intermitente con sistemas de loop automáticos en colaboración con centros de USA pioneros en estas estrategias.

2. La propuesta tiene una elevada repercusión clínica asistencial. En el momento actual aproximadamente entre un 3% y 5% de los recién nacidos son prematuros de riesgo de desarrollar un síndrome apneico con hipoxia intermitente. Ello supone con la natalidad actual aproximadamente entre 10-12.000 pacientes por año. La validación de sistemas de detección precoz y su habilitación para el uso a pie de incubadora puede permitir la identificación de los pacientes de más riesgo de desarrollar patología a medio y largo plazo y permitir una vigilancia especializada, inicio precoz de terapia, y seguimiento multidisciplinar optimizado en una primera fase. En la actualidad muchos de estos pacientes no son identificados en el período neonatal y no es hasta la edad escolar que son remitidos a centros de atención temprana, con el consiguiente retraso en el diagnóstico y tratamiento. El uso de marcadores específicos de riesgo permitiría mejorar la identificación e iniciar la terapia con mayor precocidad mejorando los resultados a nivel neurológico y conductual. Se ha demostrado que independientemente del grado de afectación, la intervención precoz de especialistas en rehabilitación, oftalmología, audiología, neurodesarrollo, etc., produce un resultado significativamente mejor en las evaluaciones en la edad escolar.

En una segunda fase, el aprendizaje desarrollado en estos estudios permitirá generalizar el uso de sistemas automáticos de control de la SatO2 y la vigilancia mediante marcadores sofisticados de la evolución de nuestros pacientes.

1) Medios humanos

El Grupo de Investigación en Perinatología (GIP) está formado por 26 investigadores. Dentro del equipo hay un grupo relevante de facultativos clínicos del Servicio de Neonatología, con amplia experiencia en la realización de estudios piloto y ensayos clínicos financiados competitivamente tanto nacionales como internacionales. Es de destacar que dentro de los clínicos contamos con un becario contratado por la Red SAMID, y dos becarios POST-MIR del IIS La Fe con dedicación exclusiva a investigación clínica y un becario Río Hortega. Además, el GIP tiene 2 becarios Miguel Servet con 2 técnicos contratados, así como un becario PFIS, y otro contratado por la Red SAMID que son químicos, biólogos, biotecnólogos, farmacéuticos y psicólogos con especialidad en seguimiento infantil. Todo este equipo está a disposición del estudio clínico presente, aunque hayamos destinado a algunos de ellos en dedicación completa y otros parcial.

El Servicio de Neonatología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HUiP La Fe) de Valencia es un centro de referencia regional para 5.5 millones de habitantes y cuenta con medios humanos y técnicos para la asistencia integral del recién nacido prematuro comprendiendo no sólo la parte médica y de enfermería neonatal altamente especializada sino también neuroimagen, neurofisiología, audiolgía, oftalmología, rehabilitación y neurodesarrollo. Además, cuenta con sistemas de monitorización integral por paciente con capacidad de registrar y almacenar variables de monitorización clínica necesarias para el estudio.

2) Medios técnicos

El GIP es un grupo acreditado por la ANEP dentro del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) y tiene por lo tanto acceso a las plataformas de metabolómica y espectrometría de masas, genómica y epigenómica de última generación donde realizar las determinaciones del estudio. La mayor parte de ellas ya han sido validadas por nuestro grupo y se han hecho ensayos múltiples en estudios previos con la colaboración de los técnicos del IIS La Fe. Las plataformas de genómica y epigenómica realizan habitualmente estudios de microRNA para otros grupos de investigación.

También disponemos de un Biobanco para almacenamiento de muestras biológicas en condiciones de seguridad y disponibilidad.

El IIS La Fe cuenta con posibilidades de asesoramiento estadístico y bioinformático que nos facilitan no sólo el diseño sino también la interpretación de los resultados y establecimiento de las correlaciones estadísticas.

Asimismo, el GIP cuenta con su propio laboratorio en el IIS La Fe donde se realiza el procesado y preparación de las muestras biológicas antes de su análisis. Nuestro grupo ha validado en los últimos años métodos de masas para las determinaciones que se van a realizar, y recientemente se han validado productos de oxidación del ácido adrénico.