

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA (Q-T)

Facultat de Medicina i Odontologia



Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

**ENSAYO CLÍNICO MULTICÉNTRICO, ALEATORIZADO
Y ENMASCARADO CON TOPIRAMATO VERSUS
PLACEBO PARA EL TRATAMIENTO DE RECIÉN
NACIDOS CON ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-
ISQUÉMICA TRATADOS CON HIPOTERMIA
MODERADA CORPORAL TOTAL**

Tesis doctoral

D. Antonio Guillermo Núñez Ramiro, licenciado en Medicina

Directores: Dr. D. Máximo Vento Torres

Dra. Dña. Pilar Codoñer Franch

Noviembre de 2020



Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

**ENSAYO CLÍNICO MULTICÉNTRICO, ALEATORIZADO
Y ENMASCARADO CON TOPIRAMATO VERSUS
PLACEBO PARA EL TRATAMIENTO DE RECIÉN
NACIDOS CON ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-
ISQUÉMICA TRATADOS CON HIPOTERMIA
MODERADA CORPORAL TOTAL**

Tesis doctoral

D. Antonio Guillermo Núñez Ramiro, licenciado en Medicina

Directores: Dr. D. Máximo Vento Torres

Dra. Dña. Pilar Codoñer Franch

Noviembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

Para empezar quiero agradecer a mis directores de tesis su apoyo y gran aportación y colaboración. A Pilar Codoñer por su magnífica disposición y rapidez en la corrección del trabajo. A Max Vento por haber visto en mí esa estrella que no todo el mundo puede ver y por haberme dado la oportunidad de “volver” y adentrarme en el mundo de la investigación. Por ser como mi padre en el hospital, por tus buenos consejos y por todos esos años compartidos, muchas gracias. Nunca lo olvidaré.

También quiero dar las gracias al grupo de investigadores del ensayo clínico Hypotop, sin vosotros este trabajo nunca hubiera sido posible.

Gracias también a los evaluadores que han corregido el texto y que sin duda lo han mejorado.

Gracias a mis compañeras de enfermería de la UCIN por colaborar siempre con una sonrisa en la obtención de las muestras que sin duda enriquecen este trabajo. Por acompañarme y ayudarme en esta y en tantas otras tareas del día a día. Y gracias también a mis compañeros del laboratorio del Grupo de investigación en Perinatología por su ayuda.

Gracias a mis compañeras del servicio de Neonatología del Hospital La Fe por colaborar siempre que ha sido posible en el reclutamiento de pacientes y la realización del estudio.

A Isabel Izquierdo, jefa de servicio, por su apoyo y comprensión.

A Marta Aguar por acompañarme desde los inicios de la residencia y enseñarme casi todo lo que se de cuidados intensivos neonatales y de bioestadística. Por cuidarme siempre, por tus sabios consejos, por tu reconocimiento y comprensión, por motivarme siempre y por estar ahí tanto en los buenos como en los malos momentos, mil gracias. A María Cernada y María Brugada, mis compañeras de faenas en el refrigerado despacho de los becarios precarios, gracias por seguir acompañándome en nuestro trabajo del día a día. A Anna Parra, gracias por alegrarme todos los días con tu eterna e intensa sonrisa y a Alejandro Pinilla por ser para mí siempre un gran apoyo. A todos vosotros, gracias por formar parte de mi vida y por vuestra amistad.

A mi amiga Bárbara, por compartir tu vida conmigo, estar siempre detrás de mí y ayudarme a levantarme en los momentos más difíciles.

A mis padres, porque sin vosotros y vuestro esfuerzo nunca hubiera llegado a ser lo que ahora soy. A mi hermano Sergio y mis sobrinos, Martina y Daniel, por haber revolucionado mi vida y hacerme sentir que siempre estaremos juntos. A mi abuela Inocencia, mujer luchadora y adelantada a su tiempo, porque allá donde estés, sigues siendo la estrella que ilumina mi camino.

A Pau, gracias por haberme encontrado y haberme elegido como compañero. Por estar siempre para mí y compartir esta nueva vida juntos.

A mis padres
A mi hermano
A Martina y Daniel
A Pau

“Los dos guerreros más poderosos son
la paciencia y el tiempo....así que recuerda:
los grandes logros toman tiempo,
no hay éxito de la noche a la mañana.”

Lev Tolstói

ÍNDICE

RESUMEN	21
1. Introducción	25
1.1 Definición	25
1.2 Epidemiología	26
1.3 Fisiopatología de la encefalopatía hipóxico-isquémica	27
1.3.1 Períodos evolutivos del daño cerebral hipóxico-isquémico	27
1.3.1.1 Fase primaria	28
1.3.1.2 Fase latente y/o periodo ventana	30
1.3.1.3 Fase secundaria.....	30
1.3.1.4 Fase terciaria.....	31
1.3.2 Mecanismos celulares de muerte neuronal en la lesión cerebral hipóxico-isquémica	31
1.3.2.1 Excitotoxicidad.....	32
1.3.2.2 Toxicidad por radicales libres.....	33
1.3.2.3 Inflamación.....	34
1.4 Metabolismo oxidativo en la encefalopatía hipóxico- isquémica	35
1.4.1 Fisiología del metabolismo aeróbico y fosforilación oxidativa mitocondrial	35
1.4.2 Evaluación del metabolismo energético	36
1.4.3 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres	38
1.4.4 Fuentes de generación de radicales libres	39
1.4.5 Sistemas antioxidantes biológicos.....	40
1.4.6 Estrés y daño oxidativo y su medición	41
1.4.7 Biomarcadores de estrés oxidativo y aplicabilidad clínica.....	42
1.4.8 Generación de radicales libres de oxígeno en la isquemia- reoxigenación.....	44
1.4.9 Fuentes de especies reactivas en la isquemia-reoxigenación.....	46
1.5 Estrategias neuroprotectoras en la encefalopatía hipóxico- isquémica	50
1.5.1 La hipotermia	51
1.5.2 Tratamiento anticonvulsivante	52

1.5.3 Terapias coadyuvantes	53
1.5.3.1 Eritropoyetina.....	53
1.5.3.2 Alopurinol o bloqueo de la xantina oxidasa	54
1.5.3.3 Melatonina	56
1.5.3.4 Xenón.....	57
1.5.3.5 Argón	58
1.5.3.6 Cannabidiol	58
1.5.3.7 Células madre.....	59
1.5.4 Topiramato: evidencia experimental y clínica	60
1.5.4.1 Farmacocinética y farmacodinámica del TPM en la etapa neonatal.....	64
1.5.4.2 Disminución de la incidencia de convulsiones.....	64
1.5.4.3 Disminución del estrés oxidativo y marcadores de daño neuronal	67
2. Hipótesis.....	69
3. Objetivos del estudio	71
3.1 Objetivo principal	71
3.2 Objetivos secundarios.....	71
4. Material y métodos	73
4.1 Diseño del estudio	73
4.1.1 Diseño	73
4.1.2 Duración	73
4.1.3 Población del estudio	73
4.1.3.1 Reclutamiento	73
4.1.3.2 Criterios de inclusión	74
4.1.3.3 Criterios de exclusión.....	75
4.1.3.4 Determinación del tamaño muestral.....	78
4.1.3.5 Aleatorización	78
4.2 Medicación del estudio	79
4.2.1 Tratamiento	79
4.2.2 Justificación de la formulación empleada y preparación de la medicación.....	80
4.2.3 Control de calidad y estudios de estabilidad de la solución oral. ..	82
4.2.4 Etiquetado y enmascaramiento de la medición	83

4.2.5	Instrucciones para la administración de la medicación.....	84
4.2.6	Almacenamiento	84
4.3	Manejo clínico durante la hipotermia	85
4.3.1	Reanimación en paritorio	85
4.3.2	Inicio de hipotermia activa: recomendaciones generales y cuidados básicos.....	85
4.3.3	Respiratorio	86
4.3.4	Hemodinámico	87
4.3.5	Hematológico	87
4.3.5.1	Coagulación.....	87
4.3.5.2	Serie blanca	88
4.3.6	Fluidoterapia y electrolitos.....	88
4.3.7	Alimentación	89
4.3.8	Sedoanalgesia y relajante muscular.....	89
4.3.9	Monitorización y manejo de las convulsiones.....	90
4.3.9.1	Tratamiento de las convulsiones.....	92
4.3.10	Recalentamiento	93
4.4	Procedimientos del estudio y valoraciones. Recogida de variables.....	94
4.4.1	Variables prenatales	94
4.4.2	Variables perinatales	94
4.4.2.1	Relacionadas con el estado objetivo de afectación perinatal	94
4.4.2.2	Relacionadas con el estado clínico de evolución a EHI moderada/grave	94
4.4.3	Transporte neonatal crítico.....	95
4.4.4	Hipotermia.....	95
4.4.4.1	Variables clínicas basales	95
4.4.4.2	Determinaciones analíticas basales	96
4.4.4.3	Electroencefalograma integrado por amplitud (aEEG).....	96
4.4.4.4	Electroencefalograma convencional (multicanal)	97
4.4.4.5	Productos de peroxidación.....	98
4.4.4.6	Farmacocinética del topiramato.....	104
4.4.4.7	Ecografía y Doppler cerebral.....	107
4.4.4.8	Resonancia magnética cerebral	108
4.4.5	Evaluación del desarrollo neurológico a largo plazo.....	109
4.4.6	Resumen del protocolo del estudio	111
4.4.7	Descripción del proceso de estudio para un paciente concreto...	112

4.4.8	Análisis de datos y métodos estadísticos	113
4.4.8.1	Entrada de datos	113
4.4.8.2	Análisis de datos	113
4.4.9	Aspectos éticos y de validez interna	115
5.	Resultados	117
5.1	Reclutamiento	117
5.2	Comprobación de la aleatorización.....	118
5.3	Objetivo principal	121
5.4	Objetivos secundarios.....	122
5.4.1	Duración y/o frecuencia de las convulsiones	122
5.4.2	Incidencia de mortalidad neonatal	124
5.4.3	Productos de peroxidación.....	125
5.4.4	Farmacocinética y farmacodinámica del topiramato	130
5.4.5	Resonancia magnética cerebral.....	136
6.	Discusión	137
6.1	Objetivo principal	137
6.2	Objetivos secundarios.....	142
6.2.1	Aspectos relacionados con el estrés oxidativo	142
7.	Limitaciones.....	147
8.	Conclusiones.....	149
9.	Bibliografía.....	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la encefalopatía hipóxico-isquémica	28
Figura 2. Mecanismo de la fosforilación oxidativa mitocondrial..	36
Figura 3. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	43
Figura 4. Niveles de biomarcadores	46
Figura 5. Mecanismo de generación de radicales libres.....	48
Figura 6. Efecto de la reoxigenación sobre la estructura mitocondrial	50
Figura 7. Escala de Sarnat modificado.	77
Figura 8. Tratamiento de las convulsiones.	92
Figura 9. Esquema del procesamiento y almacenamiento de las muestras	100
Figura 10. Etiquetado de las muestras.	101
Figura 11. Muestra del interior de las cajas.....	106
Figura 12. Descripción de las visitas del estudio.....	111
Figura 13. Diagrama de flujo que describe el proceso de estudio para un paciente.	112
Figura 14. Diagrama de flujo de pacientes	118
Figura 15. Mediana y rango intercuartil de la duración de las convulsiones	123
Figura 16. Análisis de supervivencia.....	125
Figura 17. Cambios relativos de metabolitos	127
Figura 18. Mediana de los valores plasmáticos de metabolitos relacionados con la energía y ciclo de Krebs	128
Figura 19. Media de los metabolitos de peroxidación lipídica....	130
Figura 20. Evolución de la concentración sérica de topiramato..	131

Figura 21. Concentraciones séricas de topiramato desde el inicio del tratamiento hasta el 5° día de vida	132
Figura 22. A. Incidencia de convulsiones. B. Comprobación visual del modelo predictivo	134
Figura 23. Simulaciones dosificación original y alternativa	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de variables maternas y perinatales.....	119
Tabla 2. Comparación de variables neonatales	120
Tabla 3. Incidencia de convulsiones.....	122
Tabla 4. Duración, frecuencia y características de las convulsiones	124
Tabla 5. Concentraciones de metabolitos en plasma	129

ABREVIATURAS

ACA	arteria cerebral anterior
aEEG	electroencefalograma integrado por amplitud
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATP	adenosín trifosfato
BPC	buena práctica clínica
CAT	catalasas
CRDe	cuaderno de recogida de datos electrónico
EEG	electroencefalograma
EHI	encefalopatía hipóxico-isquémica
EPO	eritropoyetina
FAE	fármaco antiepiléptico
F _I O ₂	fracción inspiratoria de oxígeno
GABA	ácido γ -aminobutírico
GPx	glutación peroxidasas
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
IL-1	interleukina 1
IR	isquemia/reoxigenación
LOO•	peroxilos lipídicos
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
NNT	número necesario para tratar
NOS	óxido nítrico sintasa
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NK	“natural killer”
•NO	óxido nítrico
•O ₂ ⁻	anión superóxido

•OH	radical hidroxilo
ONOO ⁻	peroxinitrito
8-oxodg/2dg	8-oxo-desoxiguanosina/2 desoxiguanosina
PCA	ácido perclórico
pCO ₂	presión parcial de dióxido de carbono
pO ₂	presión parcial de oxígeno
PSV+VG	ventilación con presión soporte + volumen garantizado
RM	resonancia magnética
SDA	sistema de defensa antioxidante
SIMV+VG	ventilación mandatoria intermitente sincronizada + volumen garantizado
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
TET	tubo endotraqueal
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TPM	topiramato
XO	xantina oxidasa

RESUMEN

Antecedentes: La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) perinatal constituye una de las principales causas de muerte o discapacidad a largo plazo en recién nacidos a término en el mundo occidental, afectando a aproximadamente 1-4 por cada 1000 nacidos vivos y, en consecuencia, a alrededor de 5000-20000 recién nacidos por año en Europa. La hipotermia terapéutica se ha convertido en el tratamiento estándar de la EHI moderada o grave, siendo una terapia segura y eficaz para mejorar el desarrollo neurológico tras un insulto hipóxico-isquémico perinatal. A pesar de la hipotermia y las mejoras en los cuidados intensivos neonatales, el 45-50% de los recién nacidos con EHI moderada o grave mueren o presentan alteraciones del neurodesarrollo a largo plazo. Es por esto que resulta necesario y sería deseable encontrar terapias neuroprotectoras coadyuvantes de la hipotermia que mejoren su efectividad y los resultados.

Uno de los mecanismos celulares de lesión cerebral secundaria a hipoxia-isquemia es la excitotoxicidad. Además, los fármacos anticonvulsivantes se han convertido en un punto importante en la investigación de terapias coadyuvantes a la hipotermia puesto que los cambios sinápticos y celulares secundarios a convulsiones repetidas o prolongadas son similares a los que ocurren como consecuencia de la deprivación aguda de energía. El topiramato es un fármaco antiepiléptico que inhibe la excitabilidad neuronal a través del bloqueo de los receptores de glutamato. En modelos animales experimentales se ha demostrado el efecto neuroprotector

del topiramato, sin embargo la información de la que disponemos a nivel clínico se limita a un pequeño número de estudios de viabilidad y seguridad.

Objetivo: Este estudio tiene como objetivo evaluar si la administración de topiramato comparado con placebo en recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica moderada/grave en combinación con la hipotermia, disminuye la incidencia de las convulsiones asociadas a hipoxia-isquemia, mejorando como consecuencia el neurodesarrollo.

Diseño del estudio: Estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo. Los recién nacidos con EHI fueron aleatorizados antes del inicio de la hipotermia activa al grupo topiramato o al grupo placebo. El topiramato/placebo se administró tan pronto como fue posible a través de sonda nasogástrica. Se monitorizó de manera continua la actividad cerebral mediante electroencefalograma integrado por amplitud (aEEG) para evaluar la variable principal del estudio. Los resultados secundarios incluyeron la farmacocinética y farmacodinámica del topiramato, la determinación de metabolitos del metabolismo energético y el ciclo de Krebs y biomarcadores de peroxidación lipídica y resonancia magnética cerebral para evaluar el daño cerebral.

Resultados: De 180 pacientes susceptibles de incluirse en el estudio fueron aleatorizados 110, incluyéndose finalmente en el análisis 106. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables perinatales/maternas/reanimación. La incidencia de convulsiones no fue significativamente diferente

entre los grupos de topiramato/placebo (45,2% vs 54,8%, p=NS). En las primeras 24 horas tras el inicio de la monitorización la incidencia de convulsiones en el grupo topiramato fue menor que en el grupo placebo aunque el resultado no fue estadísticamente significativo (topiramato vs. placebo: 14 (25,9%) vs. 22 (42%); p =0,221). No se observaron diferencias significativas en el resto de objetivos secundarios entre ambos grupos. El rango terapéutico del topiramato sólo se alcanzó en el 15.2% y 40.8% de los pacientes a las 24 y 48 horas del inicio, respectivamente. Se evaluaron diferentes regímenes de dosificación para lograr una alta proporción de pacientes dentro del rango terapéutico aceptado. Se seleccionó un régimen de dosificación alternativo que mostraba concentraciones de topiramato dentro del intervalo terapéutico aceptado.

Conclusiones: En el grupo topiramato observamos una tendencia hacia la disminución de la actividad convulsiva y la mortalidad asociada a EHI aunque con los datos de este estudio no podemos obtener resultados estadísticamente significativos.

1. Introducción

1.1 Definición

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI), un subtipo de encefalopatía neonatal, es un síndrome clínico de alteración del sistema nervioso central producido como consecuencia de la disminución o la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro del feto. La falta de intercambio gaseoso a nivel placentario conduce a acidemia fetal y alteraciones neurológicas más o menos graves como son disminución del nivel de conciencia, alteraciones en el tono muscular, alteraciones en los reflejos, convulsiones y dificultad para iniciar o mantener la respiración espontánea ¹. En ocasiones, durante el trabajo de parto y/o el parto, se pueden producir diversos eventos como el desprendimiento prematuro de la placenta, la rotura uterina, el prolapso de cordón umbilical, la distocia de hombros, el embolismo de líquido amniótico o la hemorragia fetomaterna conduciendo a la alteración de la oxigenación y/o perfusión del cerebro del recién nacido, lo que podría ocasionar, dependiendo de su intensidad, la muerte o evolucionar hacia una EHI ².

Los recién nacidos con EHI tienen una mayor incidencia de parálisis cerebral, afectación cognitiva, alteraciones del crecimiento y epilepsia ³. Los estudios de resonancia magnética muestran que el daño cerebral hipóxico-isquémico se caracteriza por un daño estructural en la sustancia gris (patrón de afectación de los ganglios basales, el tálamo y el córtex perirrolándico) o de menor

extensión en la sustancia blanca (patrón de afectación de zonas de vascularización limítrofe, especialmente la región parasagital) ³. No es infrecuente que ambos patrones puedan coexistir en grado variable ^{4,5}. Aquellos recién nacidos con un patrón de afectación de ganglios basales, tálamo tendrán mayor probabilidad de presentar una afectación más grave a nivel motor, desarrollando parálisis cerebral y epilepsia, mientras que en aquellos con un patrón de afectación de zonas de vascularización limítrofe predominará la alteración cognitiva ⁶. En resumen, la EHI está asociada con el desarrollo de discapacidades motoras, cognitivas, neurosensoriales y de la memoria a largo plazo y sigue siendo actualmente uno de los problemas fundamentales en la medicina perinatal.

1.2 Epidemiología

La EHI perinatal constituye una de las principales causas de muerte o discapacidad a largo plazo en recién nacidos a término en el mundo occidental, afectando a aproximadamente 1-4 por cada 1000 nacidos vivos y, en consecuencia, a alrededor de 5000-20000 recién nacidos por año en Europa, pudiendo llegar a 1 millón por año en todo el mundo ⁷. Según un estudio reciente a nivel nacional, la incidencia de EHI moderada-grave es similar a la referida en otras series ⁸.

En los últimos años, la hipotermia terapéutica se ha convertido en el tratamiento estándar de la EHI moderada o grave, siendo una terapia segura y eficaz para mejorar el desarrollo neurológico tras

un insulto hipóxico-isquémico perinatal ^{9,10}. A pesar de la hipotermia y las mejoras en los cuidados intensivos neonatales, el 45-50% de los recién nacidos con EHI moderada o grave (es decir, 2500-10000 recién nacidos por año en Europa) todavía mueren o presentan alteraciones del neurodesarrollo a largo plazo ¹¹. Las secuelas más relevantes son parálisis cerebral, dificultades de aprendizaje, comportamiento y habla, sordera y/o ceguera. Así, estos pacientes necesitarán un tratamiento de por vida global, complejo y extraordinariamente caro involucrando un amplio número de especialistas (neurodesarrollo, rehabilitación, neuropediatría, oftalmología, terapia ocupacional, psicología, etc.). Por tanto, considerando nuevos pacientes cada año más los pacientes crónicos, el problema adquiere una relevancia familiar, social, médica y económica muy importante.

1.3 Fisiopatología de la encefalopatía hipóxico-isquémica

1.3.1 Períodos evolutivos del daño cerebral hipóxico-isquémico

El daño cerebral se inicia en el momento del insulto hipóxico-isquémico y continúa durante el periodo de recuperación. En concreto, el proceso de muerte celular en el cerebro expuesto a un evento hipóxico-isquémico empieza inmediatamente y se prolonga durante un periodo de tiempo que va de días a semanas. La duración de la apoptosis y necrosis celular depende de la región y de la gravedad del daño ^{12,13}. A nivel molecular este proceso se

puede dividirse en 3 fases (Figura 1), aunque en realidad sea un *continuum* en el que puede haber interferencias entre las mismas.

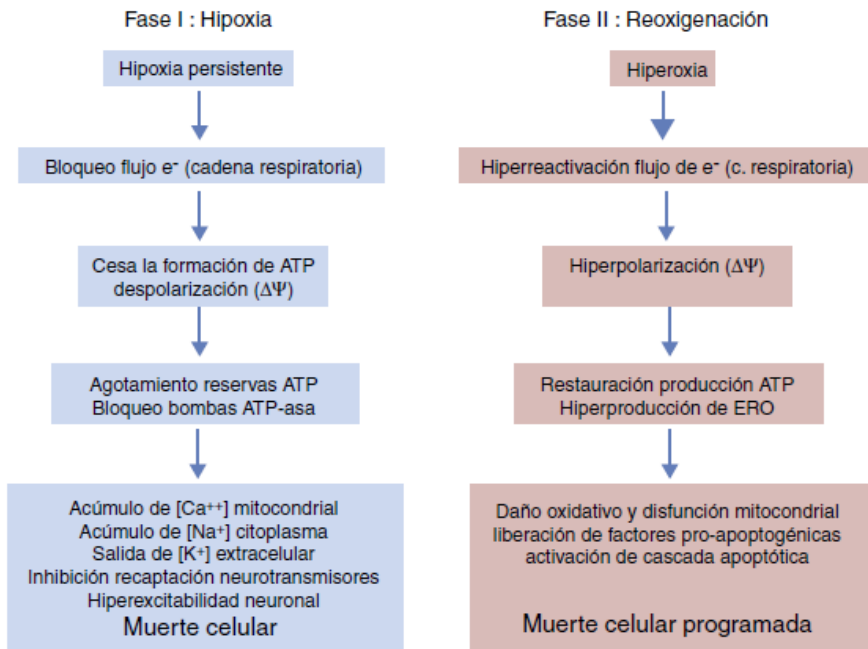


Figura 1. Fases de la encefalopatía hipóxico-isquémica.

1.3.1.1 Fase primaria

De forma inmediata tras el insulto hipóxico-isquémico tiene lugar una despolarización celular y un fallo energético primario. En esta fase se produce la muerte de las primeras neuronas que ya no se recuperarán a pesar de terapias neuroprotectoras.

Uno de los mecanismos claves que ocurre durante la fase de hipoxia es la pérdida de la autorregulación cerebral¹⁴. Dicho mecanismo en condiciones fisiológicas permite mantener estable la

velocidad del flujo sanguíneo cerebral independientemente de los cambios en la presión arterial sistémica.

La disminución o interrupción del flujo sanguíneo cerebral al feto va a producir una hipotensión arterial sistémica, hipoxia y acidosis. Ambos factores van a inducir una vasoplejía, con la consecuente pérdida de autorregulación de la circulación cerebral, conduciendo todo ello a una isquemia cerebral¹⁵. Esto se traduce en una falta de aporte de oxígeno y de nutrientes a los tejidos dañándose así las neuronas y la glía.

El cerebro inmaduro se caracteriza por tener una baja capacidad para transportar glucosa a través de la barrera hematoencefálica, por eso cuando disminuye el flujo sanguíneo cerebral los niveles de glucosa caen rápidamente iniciándose lo que conocemos como fallo energético primario.

En esta primera fase la falta de aporte de oxígeno y glucosa al cerebro se suple mediante el metabolismo anaeróbico causando acidosis láctica, depleción de ATP, disminución del transporte transcelular, acumulación de sodio, calcio y agua en el interior de la célula e inhibición de la recaptación de neurotransmisores excitatorios con hiperexcitabilidad neuronal secundaria.

La entrada masiva de calcio intracelular produce una activación de las lipasas, de la óxido nítrico sintasa (NOS), la producción de radicales libres, disfunción mitocondrial y la liberación de sustancias apoptogénicas que conducirán a la muerte celular^{15,16}

1.3.1.2 Fase latente y/o periodo ventana

Si tras el insulto hipóxico-isquémico se restaura la perfusión cerebral se producirá una recuperación parcial del metabolismo oxidativo. El periodo que ocurre entre la fase primaria y el inicio del daño secundario se conoce como fase latente y/o periodo ventana y parece ser el momento óptimo para la aplicación de algunos de los principales tratamientos neuroprotectores¹⁷. Extrapolándose de algunos trabajos realizados en animales se piensa que esta fase podría durar hasta las 6 horas post-insulto¹⁸.

1.3.1.3 Fase secundaria

La puesta en marcha de los mecanismos moleculares necesarios para iniciar la segunda fase del daño cerebral, la que se conoce como fallo energético secundario (6-48 horas) se produce a pesar de la reoxigenación.

En esta segunda fase se mantiene el estado de excitotoxicidad, empeora la función mitocondrial y el estrés oxidativo secundario a alteraciones del potencial de membrana con una reducción de la síntesis de ATP en un entorno de alcalosis intracelular a pesar de la adecuada oxigenación. Todos estos procesos bioquímicos, celulares y moleculares van a producir la liberación de factores pro-apoptogénicos y la perpetuación de la cascada apoptótica conduciendo a una muerte celular programada y agravando y

extendiendo el daño cerebral en forma de infarto tisular, necrosis neuronal selectiva y apoptosis^{15,17,19,20}.

1.3.1.4 Fase terciaria

La fase terciaria es una fase que puede durar días, semanas o incluso meses después del insulto hipóxico-isquémico y que se caracteriza por la presencia de inflamación y cambios epigenéticos que conducen a alteraciones en el crecimiento axonal, en la neurogénesis y en la sinaptogénesis^{21,22}.

1.3.2 Mecanismos celulares de muerte neuronal en la lesión cerebral hipóxico-isquémica

En condiciones normales los llamados tejidos oxirreguladores, representados por el sistema nervioso central (SNC) y el miocardio precisan una elevada cantidad de energía para el mantenimiento de los potenciales de membrana y, por ello, dependen del metabolismo aeróbico que genera energía mucho más eficientemente que el anaeróbico²³. En el SNC la transmisión del impulso nervioso precisa del concurso de las bombas iónicas ATP-asa dependientes que consumen una elevada cantidad de energía. Además, el SNC es incapaz de acumular reservas energéticas en forma de sustratos metabólicos de acción rápida como fosfocreatina o glucógeno, y depende exclusivamente de un aporte continuado de glucosa y oxígeno. Por lo tanto, la privación de oxígeno y glucosa

como consecuencia de un desequilibrio de disponibilidad y consumo de estos sustratos en el cerebro va a conducir a un rápido agotamiento de las reservas energéticas y a la lisis y muerte celular^{17,24-26}. A continuación revisaremos brevemente los mecanismos celulares de lesión cerebral secundaria a hipoxia-isquemia.

1.3.2.1 Excitotoxicidad

El glutamato es un aminoácido no esencial y es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro. Las vías glutamatérgicas desempeñan un rol importante en la plasticidad neuronal, en las funciones de memoria y aprendizaje, así como en la estabilización de las sinapsis en el cerebro en desarrollo. El glutamato se libera en la mayoría de las sinapsis y puede actuar sobre dos tipos de receptores postsinápticos, los ionotrópicos, cuyo mecanismo está asociado a canales iónicos (NMDA, AMPA/Kainato) y los metabotrópicos, que son receptores asociados a proteínas G. Cuando se produce la unión del glutamato a su receptor se desencadenan una serie de procesos intracelulares cuyo resultado final es la producción y la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra. En condiciones fisiológicas cuando el glutamato es liberado al espacio sináptico se ponen en funcionamiento las bombas de glutamato localizadas en la astrogliá para recaptarlo y que no se acumule en la sinapsis. Este mecanismo de recaptación es dependiente de energía, de manera que cuando se produce un cese

del suministro de oxígeno y glucosa tras un insulto hipóxico-isquémico prolongado, estas bombas van a fallar, produciéndose el acúmulo de glutamato en el espacio extraneuronal con la consecuente hiperactivación de los receptores NMDA/AMPA y con ello la apertura de los canales de sodio y calcio voltaje dependientes, la entrada de calcio en la célula y la lisis y muerte neuronal²⁵⁻²⁷. El exceso de calcio en las neuronas produce un aumento de la formación de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) a través del incremento de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). La generación simultánea de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) en el periodo de reoxigenación y de $\bullet\text{NO}$ dará lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-), un radical libre nitrosativo muy agresivo, contribuyendo por otro lado a la disfunción mitocondrial, dando lugar a la formación de otros radicales libres, a la liberación de sustancias apoptogénicas, conduciendo finalmente a la destrucción de las membranas celulares y la muerte neuronal²⁸.

1.3.2.2 Toxicidad por radicales libres

Los radicales libres son moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón no apareado que les confiere una gran reactividad intermolecular. El principal radical libre de oxígeno generado en las células es el anión superóxido. Este junto con su metabolito, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) son los principales compuestos que se generan de forma habitual durante el proceso de la fosforilación oxidativa

mitocondrial y que se conocen como especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo se produce como consecuencia de un desequilibrio entre la formación de radicales libres y su neutralización. En situaciones de profundo desequilibrio el estrés oxidativo va a producir daño tisular como consecuencia de la degradación de las proteínas celulares y el ADN^{29,30}. Además, como hemos comentado anteriormente y como consecuencia de la hipoxia-isquemia y de la excitotoxicidad se van a generar cantidades masivas de óxido nítrico en el interior de la célula reaccionando con el anión superóxido y produciendo peroxinitrito, iniciándose así la peroxidación lipídica de las membranas celulares, la disfunción mitocondrial, la oxidación proteica, la generación de otros radicales libres y también el desencadenamiento de la apoptosis, conduciendo todo ello a la lesión neuronal^{21,22,26,31}.

1.3.2.3 Inflamación

La hipoxia-isquemia desencadena una respuesta inflamatoria a nivel cerebral, produciéndose la activación de diferentes células, entre ellas, microglía/macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos, células NK y mastocitos y como consecuencia la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α participando junto con los mecanismos previamente descritos en el desarrollo del daño cerebral agudo^{26,32}.

1.4 Metabolismo oxidativo en la encefalopatía hipóxico-isquémica

1.4.1 Fisiología del metabolismo aeróbico y fosforilación oxidativa mitocondrial (Figura 2)

La energía necesaria para la vida de los seres pluricelulares requiere el concurso del oxígeno en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Sustratos como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos son transformados en acetil-coenzima A (acetil-coA) en la matriz de las mitocondrias. La acetil-coA es metabolizada por los distintos componentes del ciclo de Krebs. Durante este proceso se liberan electrones con un alto contenido energético que son transportados por nicotínadenín-dinucleótido y flavín-adenín-dinucleótido hasta la cadena respiratoria. La cadena respiratoria está formada por una serie de complejos enzimáticos (I, III y IV) alineados capaces de extraer protones (H^+) hasta el espacio intermembranoso generando un potencial de transmembrana. La ATP-sintasa introduce de nuevo los protones en el interior de la mitocondria a favor de potencial liberando energía que se utiliza para sintetizar ATP a partir del ADP. El oxígeno capta los electrones procedentes del ciclo de Krebs evitando que dañen las estructuras mitocondriales. El aprovechamiento energético es tal que de una molécula de glucosa se generan 36 moléculas de ATP y de una molécula de ácido palmítico 106 moléculas de ATP^{24,29,30,33,34}.

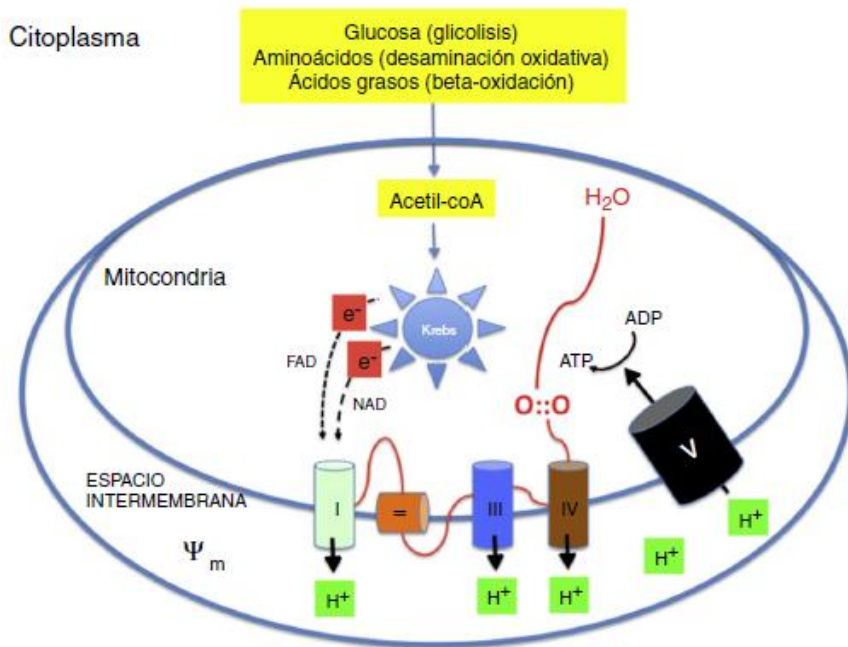


Figura 2. Mecanismo de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Los nutrientes esenciales son transformados metabólicamente en acetil-coA y liberan su energía en forma de electrones de alta energía que son transportados a la cadena respiratoria. La energía se utiliza para generar un potencial de membrana que se utiliza en la síntesis de ATP.

1.4.2 Evaluación del metabolismo energético

Existen datos limitados sobre la evolución de la mayoría de los marcadores bioquímicos en recién nacidos con EHI durante el tratamiento con hipotermia. La correlación entre el metabolismo aeróbico y la asfixia perinatal/EHI se ha evidenciado en diferentes modelos animales y en estudios clínicos³⁵. La hipotermia terapéutica no solo va a producir una disminución del metabolismo

cerebral sino que va a producir también la alteración de diversas funciones de macromoléculas.

Los niveles iniciales de lactato son un marcador bioquímico útil para evaluar el grado de asfixia al nacer³⁵. Se ha demostrado que los niveles de lactato tardaron más en normalizarse en recién nacidos asfícticos con EHI moderada/grave en comparación con recién nacidos con EHI leve³⁶.

En los adultos, la glucosa es principalmente el único combustible energético para el cerebro, mientras que en los recién nacidos es probable que los cuerpos cetónicos (acetoacetato y el β -hidroxibutirato) derivados de la cetogénesis en el hígado constituyan, al menos, una fuente de energía igual de importante para el cerebro en desarrollo³⁷. Además, se ha encontrado que las cetonas pueden actuar como moléculas neuroprotectoras³⁸. En neonatos con EHI grave se ha objetivado una depleción de cetonas, lo que podría sugerir que respuestas metabólicas sistémicas, como la cetogénesis, podría jugar un papel fundamental en la prevención del daño cerebral en la asfixia perinatal³⁹.

Un estudio reciente realizado en un modelo animal de hipoxia-isquemia en ratas ha revelado que la hipotermia logra su efecto neuroprotector a través de la supresión coordinada del contenido de acetil-CoA en tejido cerebral, metabolito que constituye un punto en común de las rutas metabólicas de la glucólisis, el catabolismo de aminoácidos y la cetólisis. Encontraron también una disminución tanto del piruvato como de los cuerpos cetónicos

(fuentes importantes para la formación de acetil-CoA) en condiciones de hipotermia³⁷.

Chouchanie y colaboradores mostró que durante la isquemia, a través del sistema lanzadera de malato/aspartato y el ciclo de nucleótidos de purina, se produce un aumento de la producción de fumarato que se convierte en succinato a través de la succinato deshidrogenasa. El acúmulo selectivo de succinato se ha descrito como indicativo de isquemia en una variedad de tejidos de ratón y rata y se cree que subyace a la lesión por isquemia-reoxigenación (IR) a través de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales. Los autores sugieren una disminución del acúmulo y oxidación del succinato como un nuevo enfoque terapéutico para la lesión por IR⁴⁰.

1.4.3 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

La reducción del oxígeno se completa con la incorporación de 4 electrones a su orbital más externo. La reactividad del oxígeno es limitada, de modo que se reduce secuencialmente (reducción lenta). Sin embargo, en presencia de metales de transición como cobre o hierro la reactividad aumenta exponencialmente (reducción rápida). La presencia de abundante hierro en el SNC incrementará, por lo tanto, los procesos oxidativos, como ocurre en la EHI. En el modo secuencial el oxígeno es reducido por un electrón a *anión superóxido* ($\bullet\text{O}_2^-$), por dos electrones a *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2) o por tres electrones a radical *hidroxilo* ($\bullet\text{OH}$). Todos estos

compuestos que se generan de forma habitual durante el proceso de la fosforilación oxidativa mitocondrial se conocen como *especies reactivas de oxígeno*. Sin embargo, algunas de estas especies, como el anión superóxido o el radical hidroxilo, y otros más como el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) o los peroxilos lipídicos ($\text{LOO}\bullet$) son *radicales libres*, es decir, son especies reactivas que tienen en su orbital más externo un electrón no apareado que les confiere una gran reactividad reaccionando con sustratos próximos para arrebatarles ese electrón que precisan para su estabilidad, generando así una reacción en cadena que puede dañar estructuras celulares. El radical libre más abundante en nuestra biología es el anión superóxido. No todas las especies reactivas de oxígeno son radicales libres; así, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque actúa como señalizador celular para numerosas funciones biológicas, puede ser un precursor de radicales libres, especialmente cuando hay presentes metales de transición ($\text{Fe}^{++}/\text{Fe}^{+++}$; Cu^+), pudiendo dar lugar a la formación del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)²⁹.

1.4.4 Fuentes de generación de radicales libres

La principal fuente fisiológica de radicales libres es la actividad mitocondrial. En la mitocondria el oxígeno se reduce completamente y, al reaccionar con protones (H^+) da lugar a la formación de agua. En situaciones de estrés metabólico (reanimación, infección, nutrición parenteral, etc.) se produce un incremento en la formación de radicales libres que puede causar

desestructuración de las mitocondrias y bloquear la generación de energía. Una fuente importante de estrés oxidativo es la activación del sistema NADPH-oxidasas (NOX) en los fagocitos como respuesta a la infección, suplementación con oxígeno o administración de ciertos fármacos^{29,30,34}.

1.4.5 Sistemas antioxidantes biológicos

El estrés oxidativo refleja una situación de desequilibrio entre la formación de radicales libres y su neutralización. Un cierto grado de estrés oxidativo es necesario para el funcionamiento de sistemas enzimáticos que precisan de las especies reactivas de oxígeno para la señalización de sus funciones celulares. Sin embargo, en situaciones de profundo desequilibrio se produce daño tisular que conduce a patología aguda y crónica³⁰.

El sistema de defensa antioxidante (SDA) incluye mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas antioxidantes eliminan las especies reactivas mediante reacciones químicas. Los SDA no enzimáticos están constituidos por proteínas que fijan a metales de transición (transferrina, ceruloplasmina, ferritina), vitaminas que bloquean la peroxidación lipídica (A, E y C) o compuestos de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas. En concreto el glutatión (tripéptido localizado a nivel intracelular con efecto protector contra las especies reactivas de oxígeno), en su forma reducida (GSH), se une a una segunda molécula idéntica para formar el glutatión oxidado (GSSG), cediendo dos electrones a un

radical libre y contribuyendo así a su normalización. El GSSG por acción de GSH-reductasa vuelve a su forma reducida. Entre las enzimas antioxidantes más relevantes están las superóxido dismutasas (SOD), que catalizan la conversión de anión superóxido en peróxido de hidrógeno; catalasas (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) que transforman el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Otros sistemas incluyen glutarredoxinas, tioredoxinas, peroxirredoxina, y las heme-oxigenasas que eliminan el complejo heme pro-oxidante de los glóbulos rojos y lo transforman en biliverdina. El SDA se desarrolla tardíamente en la gestación con la finalidad de preparar al feto para la oxigenación posnatal^{29,30}.

1.4.6 Estrés y daño oxidativo y su medición

Los radicales libres provocan alteraciones en proteínas, lípidos, glúcidos, ARN y ADN. Hay marcadores globales, como el cociente glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG).

Cuando hay una situación pro-oxidante, GSSG aumenta y el cociente disminuye, y lo contrario ocurre si hay un estado antioxidante o reductor, con aumento del GSH. Otro modo es medir la actividad de las enzimas antioxidantes. Así, frente a una mayor agresión oxidativa habrá un incremento proporcional de la actividad enzimática como respuesta protectora. Sin embargo, en la actualidad se están buscando biomarcadores que puedan detectar en fluidos biológicos los derivados de la oxidación de distintos componentes celulares. Recientemente se han validado una serie de

marcadores de daño oxidativo en los distintos biofluidos en el período neonatal⁴¹⁻⁴⁷.

1.4.7 Biomarcadores de estrés oxidativo y aplicabilidad clínica

Los biomarcadores son metabolitos que pueden ser medidos en fluidos biológicos (plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) en el laboratorio y que reflejan procesos biológicos normales o patológicos o respuestas a intervenciones farmacológicas. Clínicamente van a ser relevantes cuando sean capaces de evaluar la respuesta a un tratamiento o sean capaces de predecir resultados a corto y / o largo plazo. El biomarcador ideal va a ser aquel que tenga una elevada sensibilidad y especificidad, que sea accesible (plasma, orina, líquido amniótico, etc.) y se obtenga de la forma menos invasiva posible, que requiera un volumen pequeño y permanezca estable durante el almacenamiento, que se pueda determinar fácilmente por métodos automatizados, que sea reproducible y preferiblemente económico. Los métodos utilizados en la determinación de marcadores de estrés oxidativo son complejos y costosos económicamente, lo que ha limitado el uso de estos a estudios experimentales y de investigación⁴⁸. En la Figura 3 se resumen los principales metabolitos que se han utilizado para la evaluación del estrés oxidativo en investigación clínica en el período perinatal y las técnicas utilizadas para su medición.

Oxidative biomarkers	Target biomolecule	Modification	Biological sampling	Analytical method
Glutathione (GSH/GSSG ratio)	Antioxidants	General Redox Status	Total Blood	LC-MS/MS
o-Tyrosine (o-Tyr/Phe ratio)	Proteins		Urine	HPLC-MS/MS
m-Tyrosine (m-Tyr/Phe ratio)	Proteins		Urine	HPLC-MS/MS
3N2-Tyrosine	Proteins	Tyrosine nitration	Urine	HPLC-MS/MS
8OHdG (8OHdG/2dG ratio)	DNA		Urine/Plasma/Serum/CSF/AF	HPLC-MS/MS
F2-IsoPs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
D2/F2-IsoPs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
IsoFs	DNA	DNA oxidation	Urine/Plasma/Serum/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
NeuPs	DNA	DHA Peroxidation	Urine/Plasma/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS
NeuFs	DNA	DHA Peroxidation	Urine/Plasma/CSF/AF	GC-MS/MS; HPLC-MS/MS

Abbreviations: GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; o-Tyr: ortho-tyrosine; m-Tyr: meta-tyrosine; 3N2-Tyrosine: 3-nitrotyrosine; 8OHdG: 8-hydroxi-2'-deoxiguanosine; 2dG: 2'-deoxiguanosine; IsoPs: isoprostanos; IsoFs: isofurans; NeuPs: Neuroprostanos; NeuFs: neurofurans; AA: arachidonic acid; CSF: cerebral spinal fluid; AF: amniotic fluid; LC: liquid chromatography; GC: gas chromatography; MS/MS: tandem mass spectrometry.

Figura 3. Biomarcadores de estrés oxidativo ⁴⁸.

En estudios experimentales Saugstad y colaboradores mostraron, en un modelo animal de hipoxia en cerdos recién nacidos, que la producción de radicales libres estaba directamente relacionada con la cantidad de oxígeno utilizada durante la reoxigenación⁴⁹. Se analizaron muestras de orina y se determinaron marcadores de daño oxidativo al ADN (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina/2'-desoxiguanosina) y proteínas (orto-tirosina/fenilalanina) por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Los niveles urinarios de ambos biomarcadores fueron significativamente más altos en los cerdos que habían sido reanimados con concentraciones de oxígeno más altas⁴⁹. Estudios experimentales adicionales mostraron que la concentración de isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos y neurofuranos (productos de peroxidación lipídica) en tejido cerebral, determinados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) fueron aumentando significativamente en los cerdos recién nacidos

hipóxicos y se correlacionaron con la concentración de oxígeno proporcionada durante la reoxigenación⁵⁰.

Los isoprostanos, neuroprostanos, isofuranos y neurofuranos son moléculas similares a las prostaglandinas que se producen como resultado de la interacción de los radicales libres con el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosahexanoico (DHA), respectivamente. Actualmente estos metabolitos constituyen marcadores fiables de estrés oxidativo en el recién nacido. Los neuroprostanos y neurofuranos son subproductos del DHA, componente estructural del cerebro y, por lo tanto, los neuroprostanos y neurofuranos son marcadores relevantes de daño cerebral⁴⁸.

Recientemente, utilizando el método de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), Kuligowski y colaboradores^{46,47} analizaron un total de 536 muestras de orina durante las primeras 4 semanas de vida en 184 recién nacidos prematuros⁵¹ estableciendo un rango de referencia para los subproductos de peroxidación del AA y el DHA.

1.4.8 Generación de radicales libres de oxígeno en la isquemia-reoxigenación

La hipoxia/isquemia ocasiona una depleción de ATP que provoca una disfunción inicialmente reversible, pero si se prolonga puede llegar a ser irreversible. Los tejidos llamados oxirreguladores, cuyo

paradigma es el sistema nervioso central, son los más sensibles al déficit de oxigenación. Los estudios realizados en los años setenta demostraron que durante la reperfusión/reoxigenación después de un período hipóxico-isquémico se generaba una amplificación notable del daño inicial. La gravedad del daño por reoxigenación estaba en relación directa con el tiempo y la intensidad de la hipoxia-isquemia así como de la concentración de oxígeno utilizada durante la reoxigenación/reperfusión. En un modelo experimental de hipoxia-isquemia en cerdos recién nacidos, las lesiones histológicas del SNC y la eliminación de marcadores de daño a ADN en orina (Figura 4) fueron proporcionales a la fracción inspiratoria de oxígeno (FiO_2) utilizada durante la reoxigenación⁴⁹. En la actualidad se están estudiando marcadores específicos de hipoxia tisular. El lactato refleja con fiabilidad la intensidad de la hipoxia pero no refleja la duración de la hipoxia tisular. En un modelo experimental de cerdo recién nacido se ha demostrado que la suma combinada de metabolitos derivados de la oxidación de purinas, pirimidinas y fosfolípidos obtenidos por espectrometría de masas da lugar a un «score metabólico» fiable y reproducible para determinar la intensidad y la duración de la hipoxia cerebral y proporcionar un pronóstico o facilitar la decisión sobre la terapia más adecuada⁵²⁻⁵⁴.

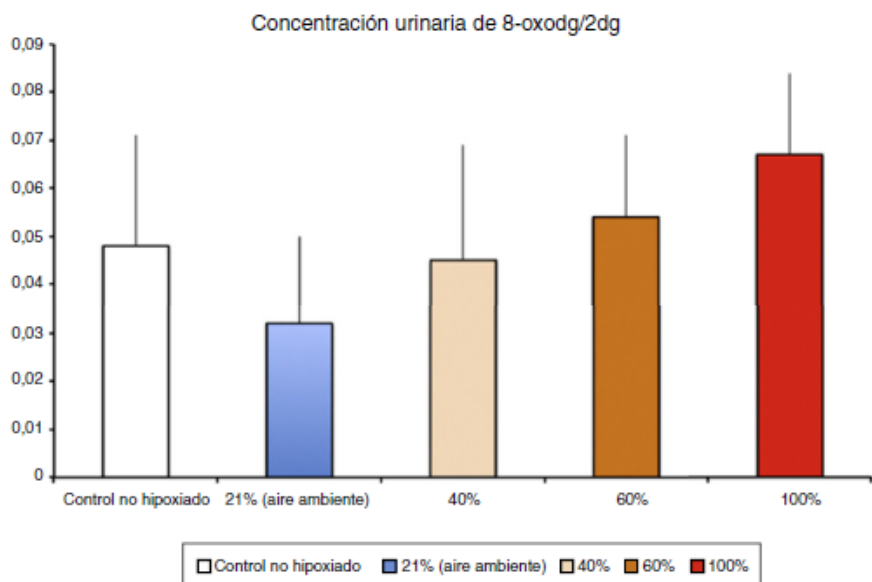


Figura 4. Niveles de biomarcadores. Los niveles relacionados con daño al ADN en un modelo de hipoxia/reoxigenación de cerdos recién nacidos correlacionaron con la fracción inspiratoria utilizada durante la reoxigenación⁴⁹.

1.4.9 Fuentes de especies reactivas en la isquemia-reoxigenación (Figura 5)

Las fuentes de especies reactivas durante la IR son múltiples, siendo las más relevantes el complejo respiratorio mitocondrial y el sistema de la xantina oxidasa (XO). También se han implicado, aunque en menor medida, el sistema NADPH oxidasa (NOX) y el desacoplamiento de la NOS³⁴.

La generación de radicales libres en condiciones normales está regulada. Los electrones que fluyen a través de la cadena respiratoria son captados casi en su totalidad (98%) por el oxígeno,

generándose tan solo un 2% de especies reactivas. Sin embargo, en situaciones de hipoxia la falta de oxígeno provoca un bloqueo de la circulación de electrones en la cadena respiratoria y un descenso del potencial de transmembrana.

Niveles muy bajos del potencial inhiben la actividad ATP-sintasa, se detiene la producción de ATP, se produce una lisis mitocondrial y la muerte celular. Durante la reoxigenación se recupera el potencial y se reinicia la síntesis de ATP. Sin embargo, la brusca reactivación del flujo de electrones ocasiona la generación excesiva de especies reactivas que pueden amplificar la lesión neuronal inicial por apoptosis^{24,33,34}.

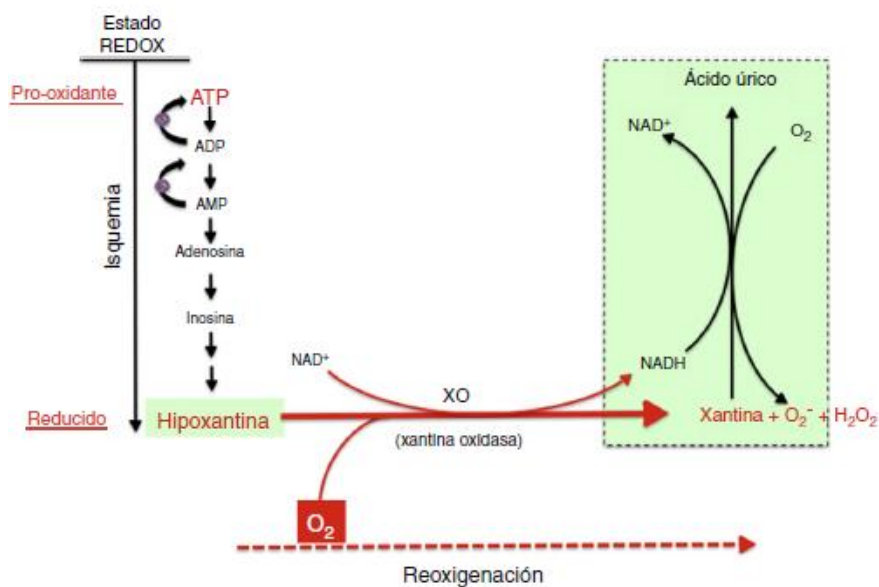


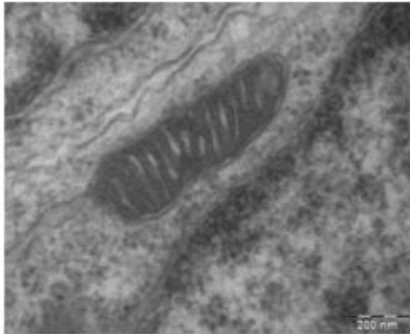
Figura 5. Mecanismo de generación de radicales libres por acción del complejo xantina óxido-reductasa. Durante la hipoxia prolongada se acumulan derivados purínicos del ATP especialmente hipoxantina. En la reoxigenación, la xantina reductasa se transforma en xantina oxidasa, que generará una elevada cantidad de especies reactivas de oxígeno, provocando un estrés oxidativo.

En la Figura 6 se muestran estudios de microscopia electrónica en cortes de cerebro de un modelo experimental de ratón sometido a hipoxia/reoxigenación en los que se ha captado la desestructuración, la edematización, la pérdida de las crestas, la rotura de las membranas y finalmente la vacuolización y la destrucción de las mitocondrias.

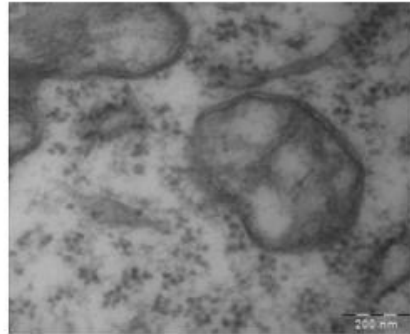
En la fase de reoxigenación de la IR, el oxígeno reacciona con la hipoxantina y la XO generando un brote de radicales superóxido y

peróxido de hidrógeno que, a su vez, darán lugar a otras especies reactivas en cadena amplificando el daño tisular inicial producido por la isquemia prolongada. La actividad de XO está también regulada a nivel postraslacional por la presión parcial de oxígeno existente en los tejidos de modo que, cuando menor es la presión 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. La generación simultánea de superóxido y de •NO daría lugar a la formación de peroxinitrito, un radical nitrosativo de gran agresividad^{55,56}.

Efecto de la reoxigenación sobre la estructura mitocondrial (microscopía electrónica)



Mitocondria: estructura normal



Mitocondria: estructura dañada por estrés oxidativo

Figura 6. Las imágenes muestran las variaciones morfológicas y estructurales que incluyen desestructuración, edematización, pérdida de las crestas, rotura de las membranas y finalmente vacuolización y destrucción de las mitocondrias cerebrales en un modelo de ratón recién nacido sometido a distintas concentraciones de oxígeno¹⁵.

1.5 Estrategias neuroprotectoras en la encefalopatía hipóxico-isquémica

La prevención de la agresión producida por especies reactivas de oxígeno requiere una intervención muy precoz, ya que esta se puede haber iniciado intraútero y se reactiva durante la reanimación postnatal. Por lo tanto, dentro del esquema de tratamiento serían intervenciones indicadas en la fase de fallo energético primario. Podrían ser realizadas o bien en la gestante durante el trabajo de parto cuando se apreciase pérdida importante del bienestar fetal o en el recién nacido con datos clínicos y/o electrofisiológicos de EHI en los primeros minutos de vida^{14,57}.

A continuación se describen las diferentes intervenciones neuroprotectoras en el daño cerebral hipóxico-isquémico.

1.5.1 La hipotermia

El daño cerebral evolutivo secundario a un insulto hipóxico-isquémico perinatal ha carecido tradicionalmente de una terapia efectiva. El abordaje terapéutico se ha limitado durante años al mantenimiento de la estabilidad clínica y normalidad bioquímica y el tratamiento de las crisis convulsivas. En la última década la hipotermia terapéutica se ha convertido en una de las innovaciones más importantes en el campo de la neonatología y en concreto en el tratamiento de la encefalopatía hipóxico-isquémica.

La hipotermia terapéutica aplicada a los recién nacidos con el diagnóstico de EHI moderada/grave, iniciada en las primeras 6 horas post-insulto hipóxico-isquémico (fase latente y/o periodo de ventana terapéutica), mantenida durante 72 horas a una temperatura de 33.5° C y con un recalentamiento gradual y lento (0.5°C/hora), ha demostrado una disminución de la mortalidad y de la discapacidad mayor en los supervivientes a largo plazo (18-24 meses)^{11,58-64}.

La hipotermia produce un descenso de la actividad metabólica de tejidos como el SNC con la consiguiente reducción de las necesidades de intercambio iónico y del consumo de ATP. El descenso en el ritmo de la actividad mitocondrial y el acoplamiento de las proteínas desacopladoras reduce significativamente la

generación de especies reactivas sin pérdida de los potenciales de transmembrana y bloqueando la liberación de proteínas apoptogénicas. Los mecanismos de acción a nivel celular y la eficacia clínica de la hipotermia han sido ampliamente investigados.

A pesar de la eficacia contrastada de este tratamiento como estrategia neuroprotectora en EHI moderada y grave, el número de recién nacidos que es necesario tratar (NNT) para evitar un caso de muerte o discapacidad grave a los 18 meses es de 6-7 en las moderadas y graves respectivamente y hasta el 45-50% de los pacientes tratados, especialmente aquellos con EHI grave, presentan pronóstico adverso^{65,66}.

1.5.2 Tratamiento anticonvulsivante

Las convulsiones son una complicación frecuente de la EHI. Es importante tener en cuenta que los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos (FAE) que son esenciales para controlar la actividad epileptiforme también pueden contribuir a una neuroprotección. Por tanto, es importante en este contexto usar FAE que no solo controlen la actividad convulsiva, sino que también puedan potencialmente suprimir la lesión evolutiva iniciada por la hipoxia-isquemia procurando neuroprotección independientemente del control de la convulsión.

Se ha demostrado que los cambios sinápticos y celulares iniciados por la privación aguda de energía por isquemia cerebral son

similares a los desencadenados por la descarga neuronal anormal inducida por las convulsiones. Así, el metabolismo energético puede verse comprometido cuando la neurona hiperactiva se mantiene en un estado de despolarización por descargas epilépticas prolongadas. Debido a esta similitud en la cascada de cambios sinápticos e intracelulares originados por la epilepsia y la isquemia cerebral aguda, los FAE han sido probados como una posible estrategia neuroprotectora en la lesión cerebral isquémica.

1.5.3 Terapias coadyuvantes

1.5.3.1 Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína endógena que se produce en los hepatocitos durante la etapa fetal y principalmente en el riñón en el periodo postnatal. Su papel fundamental es la estimulación de la eritropoyesis aunque podría tener un potencial efecto neuroprotector debido a sus efectos agudos antiinflamatorio, antiexcitotóxico, antioxidante y antiapoptótico, participando también en procesos regenerativos como angiogénesis, neurogénesis y oligodendrogénesis^{67,68}. La EPO ejerce su función tras la unión a su receptor de membrana que se expresa en el cerebro en diferentes tipos de células como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células del endotelio vascular^{67,68}. Tras un insulto hipóxico-isquémico se ha visto un aumento de la expresión de receptores de EPO en neuronas, astrocitos y microglía⁶⁹.

Los efectos de la EPO como neuroprotector en el daño cerebral han sido estudiados y demostrados en múltiples modelos animales de hipoxia-isquemia con resultados variables⁷⁰⁻⁷⁴.

En cuanto a los estudios realizados en población neonatal, un ensayo clínico reciente fase II ha demostrado que la administración de dosis múltiples de EPO sumado a la hipotermia terapéutica en recién nacidos con EHI moderada/grave disminuye el daño cerebral moderado/grave objetivado en la RM cerebral y parece que mejora la función motora al año de vida⁷⁵. Actualmente está en marcha un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo (fase III) que incluye neonatos ≥ 36 semanas con EHI moderada/grave cuyo objetivo es evaluar si la administración de dosis altas y múltiples de EPO junto con la hipotermia disminuye el resultado combinado de muerte o discapacidad neurológica a los 2 años de edad⁷⁶.

1.5.3.2 Alopurinol o bloqueo de la xantina oxidasa

El alopurinol es un inhibidor selectivo de la XO, bloqueando la conversión de hipoxantina a xantina e inhibiendo consecuentemente la producción de ácido úrico, de la generación de NO a partir de nitritos, un quelante de hierro libre así como un neutralizador de radicales hidroxilo. Todo ello lo convierte en un candidato apropiado para la neuroprotección^{77,78}.

En 1998 se realizó un estudio piloto en el que se administraron 40 mg/kg de alopurinol repartido en 2 dosis a recién nacidos con EHI.

Se observó una reducción del hierro libre no unido a proteínas, una mejoría en la perfusión cerebral, en la actividad cortical cerebral y ausencia de signos de toxicidad derivados del alopurinol⁷⁹. Sin embargo, en un estudio posterior doble ciego, la administración de alopurinol dentro de las 4 horas después del nacimiento no mostró ningún efecto beneficioso en morbimortalidad frente a placebo, lo cual se atribuyó al retraso postnatal de su administración⁸⁰. Posteriormente fueron publicados los datos de seguimiento neurológico de estos pacientes, de manera que aquellos recién nacidos con EHI moderada que recibieron alopurinol en las primeras horas después del parto (< 4 h) y una segunda dosis a las 12 horas presentaron mejores resultados a los 4-8 años que aquellos que habían recibido placebo⁸¹.

Los mismos investigadores publicaron un estudio en el que administraban alopurinol profiláctico a madres con trabajo de parto y estado fetal no tranquilizador. Los neonatos que alcanzaron niveles terapéuticos de alopurinol en sangre de cordón tuvieron niveles significativamente más bajos de proteína S-100B, un marcador de daño cerebral, así como de hierro libre no unido a proteínas, marcador de estrés oxidativo⁸².

Este grupo recientemente ha publicado un estudio multicéntrico y aleatorizado alopurinol/placebo administrado a gestantes con sospecha de estado fetal no tranquilizador durante el periodo previo al expulsivo en el que no han podido confirmar una disminución de la proteína S-100B y de los marcadores de estrés oxidativo (8-isoprostanos, neuroketal); sin embargo el análisis *post hoc*

demonstró un beneficio potencial en los recién nacidos niñas de madres tratadas con alopurinol (niveles más bajos de proteína S-100B y neuroketal)⁸³.

Actualmente se está realizando un estudio multicéntrico europeo (acrónimo ALBINO trial; EudraCT-2016-000222-19) aleatorizado, placebo/alopurinol en fase III cuyo objetivo principal es la disminución de muerte y/o discapacidad y en el que participamos 18 hospitales de la red de asistencia pública de España. Se administrará alopurinol a recién nacidos con signos precoces de encefalopatía secundaria a hipoxia-isquemia en el contexto de asfixia perinatal, en los primeros 30 minutos de vida y en los que se inicie tratamiento con hipotermia recibirán una segunda dosis 12 horas después de la primera. Se incluirán estudios de metabolómica, neurofisiología e imagen, además del seguimiento del desarrollo neurológico neonatal hasta la edad de 24 meses.

1.5.3.3 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina endógena que ha mostrado resultados prometedores en la EHI por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas. La acción antiinflamatoria se ejerce regulando a la baja (*down-regulation*) señalizadores de la inflamación y la liberación de NO neuronal. La melatonina también bloquea la liberación de proteínas proapoptogénicas por las mitocondrias y modula la acción GABA y receptores de glutamato^{84,85}.

En modelos animales de EHI ha demostrado su eficacia en monoterapia o conjuntamente con la hipotermia^{86,87}.

En cuanto a su aplicación en recién nacidos, la melatonina utilizada como coadyuvante de la hipotermia en pacientes con EHI redujo el estrés oxidativo y mejoró la supervivencia y el neurodesarrollo a los 6 meses en los pacientes tratados⁸⁸, aunque los resultados tuvieron limitaciones por el tamaño muestral. Se precisan estudios con un poder estadístico adecuado para demostrar la efectividad de la melatonina y definir bien algunos factores como la dosis y la duración óptima del tratamiento.

1.5.3.4 Xenón

El xenón es un gas noble ampliamente utilizado como anestésico general debido a su elevado perfil de seguridad y que atraviesa la placenta y la barrera hematoencefálica. Otra de sus propiedades es el bloqueo de los receptores de NMDA, lo que disminuye la excitotoxicidad²⁶. En modelos animales de hipoxia-isquemia el xenón inhalado conjuntamente con la hipotermia terapéutica ha demostrado mejoría a nivel histológico y funcional y una mayor supervivencia neuronal tras el insulto^{89,90}.

En relación con su aplicación en humanos, aunque se ha demostrado que el xenón es aparentemente seguro no parece que añada ningún beneficio a la hipotermia desde el punto de vista neuroprotector tras el episodio de asfixia perinatal⁹¹. Su principal inconveniente es el coste.

1.5.3.5 Argón

El argón es un gas noble ampliamente utilizado en la industria y que tiene, entre otras propiedades, la capacidad de activar los receptores de GABA, lo que confiere neuroprotección en el cerebro maduro⁹² y propiedades antiapoptóticas, uno de los principales mecanismos de protección cerebral del argón^{93,94}. Existe un interés creciente hacia el argón porque además de ser el gas inerte más abundante, es 200 veces más barato que el xenón.

En modelos animales de daño cerebral hipóxico-isquémico se ha demostrado un potente efecto neuroprotector^{95,96}. En un estudio realizado en crías de rata, la administración de argón (70%) tras el insulto isquémico mejoró la supervivencia celular, redujo el área de infarto y mejoró la función neurológica⁹³. En un estudio reciente realizado en crías de cerdo, la administración de argón (45-50%) en combinación con la hipotermia terapéutica demostró un mayor efecto neuroprotector en la espectroscopia y desde el punto de vista histológico⁹⁷.

Desde el punto de vista clínico están en espera de aprobación estudios fase II.

1.5.3.6 Cannabidiol

El cannabidiol es el componente principal no psicotrópico de la marihuana. Es bien conocido por ser un potente antioxidante y antiinflamatorio^{98,99} y además tiene la capacidad de disminuir la

excitotoxicidad. Es por todo ello que se ha demostrado su efecto neuroprotector en diferentes modelos animales de EHI solo o en combinación con la hipotermia¹⁰⁰⁻¹⁰⁴.

1.5.3.7 Células madre

La terapia con células madre se ha convertido en una opción terapéutica prometedora en muchas patologías en humanos, entre ellas en los accidentes cerebrovasculares dado su efecto neuroprotector y neuroregenerativo¹⁰⁵. En el recién nacido con EHI podría tener su utilidad puesto que se ha demostrado su efecto neuroprotector en modelos animales de lesión cerebral hipóxico-isquémica¹⁰⁶.

Se ha demostrado que la sangre de cordón umbilical contiene células progenitoras endoteliales, células madre mesenquimales y células mononucleares, siendo una atractiva fuente de células dada la relativa facilidad con que se podría obtener después del parto para la realización de un trasplante autólogo¹⁴. En un estudio reciente se ha demostrado que la administración autóloga de células de cordón umbilical en recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia es segura y viable¹⁰⁷.

Si bien la terapia con células madre es prometedora en estos pacientes, antes de iniciar este tipo de tratamiento se necesitan estudios para poder contestar algunas preguntas con respecto al tipo de células madre a administrar, la dosis, la ventana terapéutica,

el perfil de seguridad, investigando en profundidad los efectos a corto y a largo plazo.

1.5.4 Topiramato: evidencia experimental y clínica

El topiramato (TPM) [Sulfamato de 2,3:4,5-bis-o-(1-metiletilideno) β -D-fructopiranosas] es un fármaco antiepiléptico químicamente novedoso aprobado para el tratamiento de las convulsiones parciales y generalizadas en adultos y niños. Su actividad anticonvulsivante se debe probablemente a la supresión del tono excitatorio y/o el potenciamiento de influencias inhibitorias.

El TPM inhibe varias isoenzimas de la anhidrasa carbónica y modula los canales iónicos activados por AMPA/kainato y ácido gamma-amino butírico (GABA-A), así como los canales de sodio y calcio activados por voltaje. También puede activar la conductancia de potasio e inhibir la despolarización de respuestas mediadas por GABA-A¹⁰⁸⁻¹¹³.

Recientemente el TPM ha suscitado un gran interés como potencial agente neuroprotector en la lesión cerebral hipóxico-isquémica debido a su capacidad para inhibir la excitabilidad neuronal a través del bloqueo de los receptores de glutamato^{114,115}. También se ha demostrado que tiene efectos neuroprotectores en la leucomalacia periventricular¹¹⁵ y ha sido propuesto como un innovador tratamiento neuroprotector en el accidente isquémico cerebrovascular¹¹⁶.

Varios estudios experimentales han evaluado la eficacia del TPM en la hipoxia- isquemia en el periodo neonatal. Así, Follett y colaboradores han demostrado que el TPM administrado a roedores en edad neonatal (7º día postnatal) inmediatamente tras el insulto hipóxico-isquémico, disminuye la lesión de sustancia blanca y los déficits motores asociados¹¹⁵.

El TPM disminuye la entrada de calcio in vitro y la muerte celular mediadas por el receptor AMPA/kainato en oligodendrocitos en desarrollo. Estos datos sugieren que el bloqueo del receptor AMPA/kainato puede prevenir la lesión de sustancia blanca y que la neuroprotección conseguida con el TPM está mediada, al menos en parte, por la disminución de la lesión excitotóxica en los oligodendrocitos premielinizados en la sustancia blanca en desarrollo.

Liu y colaboradores hipotetizaron que el TPM podía incrementar la eficacia de un modelo de hipotermia post hipoxia-isquemia subóptimo (3 horas de retraso en el inicio del tratamiento) de infarto en rata neonatal. Ni el TPM ni la hipotermia diferida por sí solos conferían protección, mientras que el tratamiento combinado mejoraba tanto el desempeño funcional como la gravedad de la patología cerebral en las ratas¹¹⁷.

Estos datos fundamentan mecanismos prometedores de neuroprotección y proporcionan un fuerte impulso para futuras evaluaciones de terapia combinada de drogas con enfriamiento retrasado tras hipoxia-isquemia neonatal.

Otro estudio ha encontrado capacidad de neuroprotección del TPM administrado tras hipoxia-isquemia en cerdos recién nacidos normotérmicos. Los cerdos recién nacidos sujetos a hipoxia-isquemia mediante oclusión transitoria de la arteria carótida e hipotensión, recibían una solución salina o de TPM administrada como una dosis de carga 1 hora postinsulto seguida de dosis de mantenimiento durante tres días. Las dosis usadas en esta aplicación experimental fueron acordes al rango de dosis que se conoce como efectivo contra las convulsiones en niños. El TPM redujo significativamente la pérdida celular neuronal tras el insulto hipóxico-isquémico grave de una forma dosis dependiente. Es preocupante la evidencia del aumento de apoptosis en la sustancia blanca tras la administración de altas dosis de TPM, aunque esto no se observó en los animales tratados con dosis bajas. No se observaron efectos secundarios significativos relacionados con alteraciones del comportamiento neurológico o en la alimentación con ninguna de las dos dosis.

Los déficits neurológicos fueron menos graves en los animales tratados con TPM que en los animales tratados con placebo. El TPM no afectó significativamente a la frecuencia de las convulsiones y por tanto, estos datos indican que el potencial neuroprotector del TPM podría ser independiente de sus efectos anticonvulsivantes¹¹⁸.

Antes de que el TPM pueda ser considerado para un ensayo clínico con hipotermia, es esencial entender cómo la hipotermia afecta a su farmacocinética.

En un estudio reciente de 13 neonatos con asfixia tratados con hipotermia terapéutica corporal total, se administró TPM por vía oral a una dosis de 5 mg/kg una vez al día durante el tratamiento con hipotermia, lo cual representa el rango bajo de dosis usadas en niños para tratamiento antiepiléptico. En la mayoría de los neonatos esta pauta de dosis se asoció con concentraciones plasmáticas de TPM dentro del rango de referencia de 5-20 mg/L, mostrando que la absorción oral de TPM se mantenía durante la hipotermia. Sin embargo, las concentraciones de TPM y la vida media fueron notablemente más altas cuando se comparaban con los casos de las pocas publicaciones previas de niños normotérmicos, sugiriendo que la hipotermia reduce tanto la absorción como la eliminación de TPM. No hubo efecto aparente de terapia aditiva con fenobarbital en tres niños.

Es interesante señalar que hubo una supervivencia muy buena en este estudio (92%) y la imagen de resonancia magnética fue normal en el 46% de los niños tratados¹¹⁹.

En un estudio reciente, se comparó retrospectivamente el perfil de seguridad de los neonatos tratados con hipotermia más TPM con neonatos tratados solo con hipotermia. Los recién nacidos fueron tratados en las primeras 6 horas tras el nacimiento con hipotermia profunda (30-32°C) o moderada (32-34°C) y el TPM se administró a través de sonda orogástrica durante los tres primeros días de vida (5 mg día 1, 3 mg día 2 y 3). Se monitorizaron los niveles plasmáticos de TPM. Los autores concluyeron que el TPM era seguro y el resultado a corto plazo era positivo pero que se

necesitaban estudios con un mayor número de pacientes para alcanzar significación estadística y confirmar la mayor neuroprotección conseguida al administrar topiramato junto al tratamiento con hipotermia¹²⁰.

1.5.4.1 Farmacocinética y farmacodinámica del TPM en la etapa neonatal

La literatura publicada referente a la farmacocinética y farmacodinámica del TPM en el periodo neonatal es escasa e incluso aún más escasa durante la hipotermia.

El presente estudio ha permitido estudiar tanto la farmacocinética como la farmacodinámica del TPM en recién nacidos en tratamiento con hipotermia lo que mejorará el conocimiento de ambos aspectos de la farmacología pudiendo optimizar la dosificación y confirmado la seguridad y efectividad del topiramato como neuroprotector en los pacientes con EHI.

1.5.4.2 Disminución de la incidencia de convulsiones

Los recién nacidos con convulsiones clínicas tienen mayor riesgo de morbimortalidad. En un estudio de 82 neonatos con convulsiones clínicas, el 27% desarrollaron epilepsia, el 25% desarrollaron parálisis cerebral, el 20% tuvieron retraso mental y el 27% tuvieron dificultades del aprendizaje¹²¹. En otro estudio de 89 recién nacidos a término con convulsiones clínicas, la mortalidad fue del 7% y el 28% de los supervivientes tuvo un resultado

desfavorable¹²². Sin embargo, el resultado depende en gran medida de la etiología de la encefalopatía y convulsiones^{121,122}.

Estudios en animales sugieren que las convulsiones neonatales podrían dañar el desarrollo cerebral y conducir a alteraciones del neurodesarrollo a largo plazo, incluyendo epilepsia¹²³⁻¹²⁵.

En recién nacidos con EHI las convulsiones se asocian con alteración del metabolismo cerebral¹²⁶ y se ha demostrado que la presencia de crisis convulsivas eléctricas se asocia con la gravedad de la lesión cerebral (evaluada por RM) en recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia, independientemente del patrón de base del EEG integrado por amplitud (aEEG)¹²⁷.

Un estudio evaluó 218 recién nacidos a término con encefalopatía moderada a grave en tratamiento con hipotermia selectiva de la cabeza y monitorización con aEEG. En el análisis multivariante, la ausencia de crisis eléctricas se asoció con tasas más bajas de muerte y discapacidad severa a los 18 meses¹²⁸.

En un ensayo clínico de hipotermia terapéutica en el que se realizó monitorización con aEEG, la presencia de convulsiones se asoció con un resultado desfavorable (49% sin convulsiones vs. 67% con convulsiones)⁵⁸.

Un aspecto importante inherente al tratamiento de la EHI es el control de las convulsiones. La excitotoxicidad es una característica frecuente de la EHI. Al disminuir la recaptación de neurotransmisores de manera drástica como consecuencia de una falta de energía en las bombas de recaptación dependientes de ATP en la astrogliá, se acumula una cantidad excesiva de los mismos en

el espacio sináptico. La hiperexcitabilidad y como consecuencia las convulsiones constituyen un factor de riesgo importante para incrementar el daño neuronal. La clínica y preclínica con TPM muestra que éste ejerce un control eficaz sobre los receptores GABA dependientes (AMPA, NMDA, receptores de kainato) traduciéndose en una herramienta muy valiosa para el control de las convulsiones en la edad adulta y pediátrica.

A pesar de los datos limitados de eficacia y seguridad, actualmente el fenobarbital continúa siendo el fármaco de elección para el tratamiento de las convulsiones neonatales. La dosis inicial de carga de 10-20 mg/Kg y las dosis de mantenimiento de 2,5-5 mg/Kg/día son las empleadas habitualmente en la práctica clínica. Estudios recientes han demostrado sin embargo que el fenobarbital puede ser muy tóxico, induciendo apoptosis en neuronas de ratas recién nacidas tanto pretérmino como a término¹²⁹⁻¹³². Por tanto, encontrar una alternativa al fenobarbital sería una prioridad en la farmacología neonatal.

Basándonos en estudios previos experimentales y piloto, hipotetizamos que el TPM podría también controlar las convulsiones en los neonatos con EHI moderada-grave disminuyendo la necesidad de otros fármacos antiepilépticos.

1.5.4.3 Disminución del estrés oxidativo y marcadores de daño neuronal

El uso de TPM para reducir la actividad convulsiva disminuirá la inflamación cerebral, el estrés oxidativo asociado y el daño de las células neuronales (neuronas, oligodendroglía, astrogía y microglía).

2. Hipótesis

La administración de topiramato a niños recién nacidos con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica moderada/grave reduce la excitotoxicidad neuronal. Como consecuencia disminuirá la incidencia, la duración y/o la frecuencia de las crisis convulsivas así como sus complicaciones a corto y largo plazo, mejorando los resultados del neurodesarrollo evaluado a los 24 meses de edad postnatal.

3. Objetivos del estudio

3.1 Objetivo principal

Evaluar si la administración precoz de topiramato comparado con placebo en recién nacidos con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica moderada/grave, además de la hipotermia terapéutica, disminuye la incidencia de las convulsiones asociadas a hipoxia-isquemia (evaluado mediante electroencefalografía integrada por amplitud), mejorando como consecuencia el neurodesarrollo.

3.2 Objetivos secundarios

- a) Evaluar si la administración precoz de topiramato comparado con placebo en recién nacidos con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica moderada/grave, además de la hipotermia terapéutica, disminuye la duración y/o frecuencia de las convulsiones asociadas a la hipoxia-isquemia.
- b) Evaluar el efecto del topiramato añadido a la hipotermia en reducir la incidencia de la mortalidad neonatal asociada a EHI.
- c) Evaluar la eficacia del topiramato sobre el neurodesarrollo a los 24 meses de edad postnatal mediante la realización de la Escala de Bayley III.
- d) Evaluar el efecto del topiramato añadido a la hipotermia en:
 - El daño cerebral evaluado por ecografía cerebral.

- El daño cerebral evaluado por resonancia magnética cerebral a los 7 días de vida.
 - Los biomarcadores de daño neuronal y estrés oxidativo y metabolitos del metabolismo energético.
- e) Evaluar la seguridad del topiramato en recién nacidos tratados con hipotermia.
- f) Estudiar la farmacocinética y farmacodinámica del topiramato en recién nacido tratados con hipotermia.

4. Material y métodos

4.1 Diseño del estudio

4.1.1 Diseño

Estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo (estudio fase III).

4.1.2 Duración

El período de reclutamiento fue de 2 años y el de seguimiento de 2 años más, siendo la duración total de 4 años.

4.1.3 Población del estudio

Recién nacidos ≥ 36 semanas de edad gestacional y ≥ 2000 g de peso al nacimiento con asfixia perinatal y EHI moderada/ grave.

4.1.3.1 Reclutamiento

Los pacientes se reclutaron en 13 centros españoles referencia de EHI donde se realiza hipotermia terapéutica. Se incluyeron tanto los nacidos en los centros de referencia donde se realizó el estudio como los nacidos en hospitales secundarios, siempre y cuando se trasladaran al centro de referencia antes de las 6 horas tras el nacimiento, estando dentro del tiempo de ventana terapéutica para el inicio de la hipotermia.

Tras el nacimiento o el traslado en caso de proceder de un hospital secundario y tras solicitar el consentimiento a los padres, se realizó la aleatorización, asignándose al grupo de topiramato o placebo.

La primera dosis se administró tan pronto como fue posible tras la obtención del consentimiento y siempre antes de las 8 horas de vida.

4.1.3.2 Criterios de inclusión

- Consentimiento informado firmado por padres o representante legal.
- Edad gestacional ≥ 36 semanas.
- Peso al nacer ≥ 2000 gramos.
- Estado neonatal clínico de encefalopatía hipóxico-isquémica moderada o grave evaluada mediante la clasificación de Sarnat modificado¹³³ (Figura 7).
- Signos evidentes de asfixia durante el parto: meconio y/o alteración del ritmo cardíaco.
- Nacidos en los centros de referencia o llegada al mismo dentro del periodo de aplicación de la hipotermia (6 horas tras el nacimiento).
- El paciente debe cumplir al menos un criterio de A y uno de B:

A. Existencia de datos perinatales compatibles con situación de hipoxia- isquemia periparto:

- Estado fetal no tranquilizador durante la monitorización fetal.
- pH patológico de cuero cabelludo (<7.2).
- Existencia de un evento hipóxico-isquémico centinela (patología del cordón, desprendimiento de placenta, rotura uterina, hemorragia fetal grave).
- Distocia de parto.

B. Estado objetivo de afectación perinatal:

- Apgar ≤ 5 a los 5 minutos.
- Necesidad de reanimación con ventilación con presión positiva (con mascarilla o con TET) a los 10 minutos de vida.
- pH ≤ 7 valorado en la peor gasometría de los primeros 60 minutos (obtenida en sangre de cordón, arterial, venosa, capilar).
- Déficit de bases ≥ 16 mmol/L valorado en la peor gasometría de los primeros 60 minutos (obtenida en sangre de cordón, arterial, venosa, capilar).

4.1.3.3 Criterios de exclusión

- Edad gestacional < 36 semanas.
- Peso al nacer < 2000 gramos.
- Cualquier patología que requiera cirugía antes del alta.
- Malformaciones congénitas mayores.

- Muerte inminente.
- Cromosomopatías.
- Rechazo a participar y/o firmar el consentimiento informado.
- Imposibilidad de aleatorización o aleatorización errónea.
- Incapacidad de iniciar hipotermia activa o pasiva en el periodo de ventana de 6 horas (temperatura rectal $\leq 34^{\circ}\text{C}$).
- Empleo de otro agente en investigación.

	LEVE	MODERADA	SEVERA
1.- Nivel de alerta (capacidad de despertar)	Normal	Letargia	Estupor o coma
2.- Actividad espontánea (cantidad y calidad)	Normal o hiperexcitabilidad Movimientos fluidos, variables y de contorno	Disminuida Pobre repertorio de movimientos	Ausente o estereotipada Respuesta de retirada, movimientos de decorticación o descerebración
3.- Actividad neuromuscular			
Tono	Normal	Leve hipotonía	Flácido
Postura	Adecuada flexión y aducción de 4 extremidades	Pobre flexión de 4 extremidades	Postura flácida o tónica sostenida
4.- Reflejos			
Primitivos			
Succión	Débil	Débil	Ausente
Moro	Normal	Incompleto	Ausente
Miotáticos	Aumentados	Débiles	Ausentes
5.- Sistema autonómico.			
Pupilas	Midriasis	Miosis	Desigual, fija o dilatada. Pobre reflejo lumínico
Respiración	Normal o taquipnea por acidosis	Periódica o irregular	Apnea o respiración apneusica o neurógena central
6.- Convulsiones.	No	Presentes	Convulsión repetitiva o estatus

Figura 7. Escala de Sarnat modificado.

4.1.3.4 Determinación del tamaño muestral

La variable principal del estudio es la reducción de la incidencia de las convulsiones asociadas a la encefalopatía hipóxico-isquémica. De acuerdo con datos de la literatura la incidencia de convulsiones en la población de los recién nacidos con este tipo de patología oscila, según las series, entre 32% y 62%^{4,127,134-137} y según datos del Hospital La Fe de Valencia (no publicados), la incidencia de convulsiones es de aproximadamente del 50% por lo que hemos elegido la incidencia de 50% para el cálculo del tamaño muestral.

Consideramos clínicamente significativa una reducción absoluta del 50% (pasar del 50% al 25%) con una relación entre grupo experimental y control de 1:1, un nivel de significación alfa de 0,05 y un riesgo β del 10%. Con estas premisas se precisa un total de 84 pacientes.

Dada la duración del estudio por su seguimiento a medio plazo, se previeron unas pérdidas del 15% por lo que sería necesario reclutar 100 pacientes en total.

4.1.3.5 Aleatorización

Los números de aleatorización fueron proporcionados por un programa informático, preparándose las listas de aleatorización y que se conservaron en el Servicio de Farmacia del Hospital

Universitari i Politènic La Fe para el etiquetado ciego y el envasado de la medicación del estudio.

La aleatorización se realizó en bloques de 4.

Cada envío de la medicación a los centros de estudio comprendió bloques completos de 4, logrando así la estratificación por centro.

El Servicio de Farmacia del Hospital Universitari i Politènic La Fe preparó la medicación del ensayo de acuerdo a un código preestablecido con un aspecto externo indistinguible y en un mismo volumen y concentración por vial de 5 mg/mL. El envío se realizó a los servicios de Farmacia de los diferentes centros participantes.

Los pacientes fueron asignados de manera secuencial al número de aleatorización más bajo por orden de entrada en el estudio en cada centro.

4.2 Medicación del estudio

4.2.1 Tratamiento

Intervención: Topiramato solución oral a una concentración de 5 mg/mL a partir de Topamax[®] 100 mg comprimidos (Janssen-Cilag, Cologno Monzese, Milán, Italia) en viales de cristal topacio de 30 mL. La primera dosis de 5 mg/kg (1 mL/kg) se administraba tan pronto como el paciente se encontrara estabilizado y siempre antes de las 8 horas de vida. Las siguientes dosis serán de 3 mg/kg (0,6 mL/kg) cada 24 horas y se administraron un mínimo de 5 días y hasta un máximo de 7 días. La medicación se administró a través de sonda nasogástrica.

Control: Placebo (agua estéril para inyección, Grifols®) a la misma dosis y mismo intervalo terapéutico que en el grupo intervención.

En el caso de que el paciente presentara crisis, el tratamiento se administraba un mínimo de 5 días y se suspendía las 48 horas de ceder las crisis, administrándose un máximo de 7 días.

En el caso de que el paciente no presentara crisis, la medicación del estudio se administraba durante 5 días (48 horas tras el recalentamiento).

4.2.2 Justificación de la formulación empleada y preparación de la medicación

Se decidió preparar el topiramato a una concentración de 5 mg/mL porque facilita el cálculo de dosis a administrar al paciente y se parte de los comprimidos de Topamax® en lugar de principio activo para no tener que realizar ningún estudio de calidad de la materia prima y que no se considerara como una formulación nueva sino como un acondicionamiento de la especialidad (de acuerdo a consulta realizada a la Agencia española del Medicamento en fecha 29 de marzo de 2012). El Topamax® en cápsulas dispersables se desechó también porque los gránulos no se deshacen en agua a pesar de agitación continua y porque el color hace imposible el enmascaramiento.

Se obtuvo una solución final transparente incolora para que fuera indistinguible del placebo, lo cual conllevó la dificultad de eliminar

todos los componente (excipientes) insolubles del comprimido de Topamax[®] de 100 mg utilizado como especialidad de partida.

Excipientes del comprimido: lactosa monohidrato, almidón de maíz pregelificado, celulosa microcristalina, glicolato sódico de almidón de patata (tipo A), estearato magnésico. El recubrimiento de la película: Opadry[®]: hipromelosa, magrogol, polisorbato 80 y colorante (E-171 y E-172).

Se planteó la realización de un estudio de estabilidad para garantizar que la solución fuera estable el tiempo suficiente para garantizar la logística del ensayo (preparación, distribución) y el tiempo hasta su administración al paciente en condiciones óptimas. Para poder disponer de la información con la mayor premura posible para obtener datos de estabilidad de al menos 6 meses, y con los medios disponibles, se preparó la muestra de ensayo de la siguiente forma: se adicionaron 5 comprimidos de Topamax[®] 100 mg a un mortero, se añadió un poco de agua, esperando unos minutos hasta que se disolviera la cubierta. A continuación se pulverizaron los comprimidos hasta obtener una pasta fina homogénea. Se adicionó una nueva porción de agua hasta obtener una suspensión más fluida. Posteriormente se transfirió a un vaso de precipitado. Se lavó el mortero con porciones de agua para arrastrar el remanente de la suspensión y se vertió al vaso de precipitado hasta un volumen final próximo a 100 mL. Se dejó la suspensión en el agitador magnético aproximadamente a 500 rpm

durante unas 15 horas. Transcurrido dicho tiempo, se transfirió la suspensión a un matraz aforado, enrasando hasta el volumen final. Se volvió a homogenizar la suspensión final agitando unos minutos.

Para obtener la solución final y dado que se requería muy poco volumen (unos mL) para la realización del ensayo, la suspensión se prefiltró a través de un filtro hidrofílico de 0.45 μm (Millipore) y luego a través de un filtro de 0.22 μm (Stericap®, filtro Millipore express plus) en la campana de flujo laminar horizontal, obteniéndose finalmente una solución transparente, incolora y estéril.

La solución obtenida estaba lista para envasar en cabina de flujo laminar horizontal, en frascos topacio estériles de 30 mL con tapón precinto.

4.2.3 Control de calidad y estudios de estabilidad de la solución oral. Liberación de lotes

Antes de la liberación de lotes por el farmacéutico responsable se realizaron los siguientes estudios de calidad, incluyendo: características organolépticas y fisicoquímicas (partículas y pH), microbiológicas (tioglicolato y cultivo de agar sangre para bacterias y cultivo en medio líquido Saboureaud para hongos) y control cuantitativo. Se realizó también el correspondiente análisis para verificar que la concentración de la solución era la esperada. La determinación de la concentración de topiramato en las muestras se

realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS) utilizando el sistema AcquityUPLC acoplado a un detector de cuadrupolo triple MS Xevo-TQ con interfaz de electrospray (ESI) (Waters, Manchester, Reino Unido).

4.2.4 Etiquetado y enmascaramiento de la medición

El etiquetado de la medicación en su envase definitivo se realizó en el Servicio de Farmacia del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia en la Unidad de Farmacotecnia.

La medicación fue etiquetada con etiquetas correspondientes a pacientes cuyo número de aleatorización correspondiera a ese tratamiento. Estas etiquetas fueron generadas por la Unidad de Ensayos Clínicos del Servicio de Farmacia para los frascos de topiramato y placebo por separado.

En las etiquetas se reflejó el número de aleatorización impreso, que se obtuvo de la lista de aleatorización por bloques.

La etiqueta contenía la siguiente información:

Protocolo: 1645-CI-058 *Muestra para investigación clínica*
Contenido: TOPIRAMATO/PLACEBO solución ORAL 5mg/ml 30 ml
Número de paciente: _____ Número de aleatorización: 8401
Dosis: Primer día: 5 mg/kg/día. Resto días: 3mg/k/día
Conservar en **Nevera** una vez abierto. *Mantener fuera del alcance de los niños.* Investigador principal:
Lote de fabricación: _____ Fecha de caducidad:
Promotor: IIS La Fe. Bulevar Sur, s/n 46026-Valencia Teléfono: xxxxxxx

4.2.5 Instrucciones para la administración de la medicación del estudio

El volumen de la solución a administrar se tomó mediante jeringa y se administró a través de sonda nasogástrica. Tras la administración del tratamiento se procedió al lavado de la sonda con 2 mL de agua destilada/suero glucosado al 5% y se mantuvo cerrada durante al menos 1 hora.

En el caso de estar recibiendo alimentación enteral, esta se administró 1 hora antes de la toma.

En el caso de aparecer vómitos en los 30 primeros minutos tras la administración del tratamiento se repitió la dosis. Si pasaban más de 30 minutos se desaconsejaba volver a administrarlo.

4.2.6 Almacenamiento

Los frascos fueron guardados a temperatura ambiente por el tiempo establecido en la etiqueta. Una vez abierto el vial, este se conservaba en nevera a 2 – 8 °C para la administración de las siguientes dosis.

4.3 Manejo clínico durante la hipotermia

4.3.1 Reanimación en paritorio

- Apagar el calor radiante una vez que el paciente haya sido estabilizado en aquellos pacientes susceptibles de desarrollar una encefalopatía hipóxico-isquémica o aquellos que requieran una reanimación avanzada y /o tengan una puntuación de Apgar < 5 a los 5 minutos.
- Prevenir la hipertermia. Se recomienda monitorizar la temperatura corporal, evitando que la temperatura sea superior a 37,5 °C.
- Evitar la hiperoxia ya que esta incrementará el estrés oxidativo. Se recomienda iniciar la reanimación con aire ambiente puesto que mejora los resultados¹³⁸. Además la hiperoxia precoz en pacientes con acidosis perinatal grave en el contexto de asfixia perinatal se asocia con un mayor riesgo de EHI¹³⁹. Se recomienda utilizar un pulsioxímetro durante la reanimación y ajustar la FiO₂ en función del nomograma de saturación¹⁴⁰.
- Evitar la administración de expansores de volumen y la administración de bicarbonato por la alcalemia paradójica con acidosis tisular.

4.3.2 Inicio de hipotermia activa: recomendaciones generales y cuidados básicos

- Colocar al paciente en cuna térmica apagada sobre el colchón de enfriamiento del equipo de hipotermia y conectar.

- Controlar la temperatura central de forma continua mediante la colocación de una sonda rectal introducida 5 – 6 cm en el recto (una para el equipo de hipotermia y otra para el monitor). Además monitorizar una temperatura no invasiva mediante un sensor cutáneo en el pliegue axilar o frontal.
- Monitorizar la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, el electrocardiograma y la saturación periférica de oxígeno.
- Monitorizar la saturación regional de oxígeno cerebral.
- Monitorizar la función cerebral mediante aEEG.
- Se recomienda la monitorización transcutánea de la $p\text{CO}_2$ y la $p\text{O}_2$.
- Canalizar arteria y vena umbilicales y colocar sonda vesical para control de diuresis y sonda nasogástrica.
- Mantener una temperatura rectal de $33,5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas.

4.3.3 Respiratorio

- No modificar la humedad de las tubuladuras y ventilar con aire húmedo y caliente.
- Mantener $p\text{CO}_2$ entre 35 - 45 mmHg (ajustando el gasómetro a la temperatura corporal). Si precisa intubación evitar la hipocapnia puesto que produce vasoconstricción arterial cerebral y podría agravar el fallo energético secundario. Para ello, utilizar modalidades parcialmente asistidas como por ejemplo PSV + VG o SIMV + VG). Si no es posible ajustar la temperatura del

gasómetro los niveles normales de $p\text{CO}_2$ para una temperatura corporal del $33,5\text{ }^\circ\text{C}$ son entre $45 - 55\text{ mmHg}$.

4.3.4 Hemodinámico

- Mantener un rango de frecuencia cardiaca entre $80 - 100\text{ lpm}$ durante la fase de mantenimiento de la hipotermia.
- Evitar expansiones de volumen, especialmente de forma brusca.
- Mantener la tensión arterial media en rango adecuado ($45-65\text{ mmHg}$) para mantener un gasto cardíaco dentro de la normalidad. Si hay signos de disfunción miocárdica se recomienda realizar ecocardiograma y valorar la utilización de fármacos inotropos (dobutamina, dopamina, adrenalina).

4.3.5 Hematológico

4.3.5.1 Coagulación

Durante la hipotermia se prolongan los tiempos de coagulación, aumenta la viscosidad de la sangre y se puede producir una disminución del número de plaquetas que además son disfuncionantes. Ante sospecha de alteración de coagulopatía o hemorragia perinatal, se recomienda transfusión de plasma previo al inicio de la hipotermia.

4.3.5.2 Serie blanca

Durante la hipotermia está aumentado el riesgo de sepsis por disminución del recuento leucocitario e inhibición de la actividad antimicrobiana por lo que se recomienda iniciar tratamiento antibiótico profiláctico.

4.3.6 Fluidoterapia y electrolitos

- Se recomienda restricción hídrica inicial con aportes totales entre 40 – 60 mL/kg/d debido a la posible afectación renal.
- Sodio, potasio y cloro: tendencia a disminuir durante la hipotermia, secundario a síndrome de fuga capilar, con aumento durante la fase de recalentamiento al volver el líquido intersticial al espacio intravascular. Se recomienda corregir hasta niveles en límite inferior de la normalidad.
- Calcio y magnesio: en los neonatos asfícticos son frecuentes los trastornos metabólicos transitorios, entre ellos la hipocalcemia e hipomagnesemia. Se recomienda mantener magnesemia entre 1,6 – 2,2 mg/dL.
- Glucosa: tras el insulto hipóxico-isquémico es frecuente que las reservas de glucosa se deplecionen con facilidad por aumento de la actividad glucolítica en el contexto del metabolismo anaeróbico, encontrándonos de manera frecuente hipoglucemia tras la asfixia, lo que puede agravar el fallo energético secundario. Durante la fase de hipotermia existe una tendencia a la

hiperglucemia probablemente secundario a la disminución del metabolismo celular mientras que durante el recalentamiento puede haber un aumento de las necesidades de glucosa con riesgo de hipoglucemia. Es por todo esto que se recomienda un control estrecho de las cifras de glucemia, evitando la hipoglucemia pero también la hiperglucemia, manteniendo cifras de glucemia entre 60 - 120 mg/dL.

4.3.7 Alimentación

La incidencia de enterocolitis necrotizante es baja y no parece aumentar como consecuencia de la hipotermia. Una vez pasado el momento agudo tras el insulto, valorar iniciar alimentación enteral trófica con leche materna o leche materna de donante hasta un máximo de 20 mL/kg/d durante la fase de mantenimiento de la hipotermia.

4.3.8 Sedoanalgesia y relajante muscular

La hipotermia puede no ser efectiva si el paciente presenta signos clínicos de estrés (ceño fruncido, puños fuertemente cerrados, irritabilidad, frecuencia cardíaca > 120 lpm, etc.), por lo que se recomienda que en todos los pacientes incluidos en este estudio se utilice sedación.

Los fármacos y dosis de inicio fueron:

- Morfina en perfusión continua a dosis de 5 – 20 µg/kg/h. Iniciar a 10 µg/kg/h y ajustar según respuesta. La morfina presenta un

aclaramiento lento durante la hipotermia pudiendo incrementar su concentración hasta niveles potencialmente tóxicos. En algunos casos es posible que se requiera cambiar a fentanilo en perfusión continua debido a tolerancia al cloruro mórfico.

- Se recomienda no utilizar midazolam para controlar el estrés por frío.
- Se recomienda no utilizar relajantes musculares, únicamente si fuera necesario y de manera excepcional para evitar la hiperventilación central o como tratamiento de la hipertensión pulmonar recordando que el metabolismo se enlentece y hay riesgo de efecto acumulativo.

4.3.9 Monitorización y manejo de las convulsiones

Para la monitorización continua de la actividad cerebral y la detección de actividad epiléptica y patrones anormales durante la hipotermia se utilizó un monitor de aEEG.

Se trataron las crisis electroclínicas, es decir, todas aquellas con cualquier patrón de expresión clínica con correlato en el aEEG y en el electroencefalograma (EEG) crudo y también las eléctricas, es decir, aquellas sin expresión clínica identificable por el observador (disociación electroclínica).

Se trataron las crisis aisladas (< 1 episodio/hora), repetidas (≥ 2 episodios/hora) y el estatus epiléptico, identificado como un patrón en cepillo por crisis repetidas durante ≥ 30 minutos o por elevación persistente de la línea inferior y superior del registro de

aEEG. Valorar ante una única crisis de corta duración con remisión espontánea esperar a la repetición de la crisis para iniciar tratamiento anticomitial. Ante una convulsión clínica sin correlato eléctrico en el aEEG o en el EEG crudo, se deja a criterio del clínico la decisión de iniciar o no tratamiento anticomitial.

4.3.9.1 Tratamiento de las convulsiones

El algoritmo que se siguió para el tratamiento de las convulsiones está reflejado en la Figura 8.

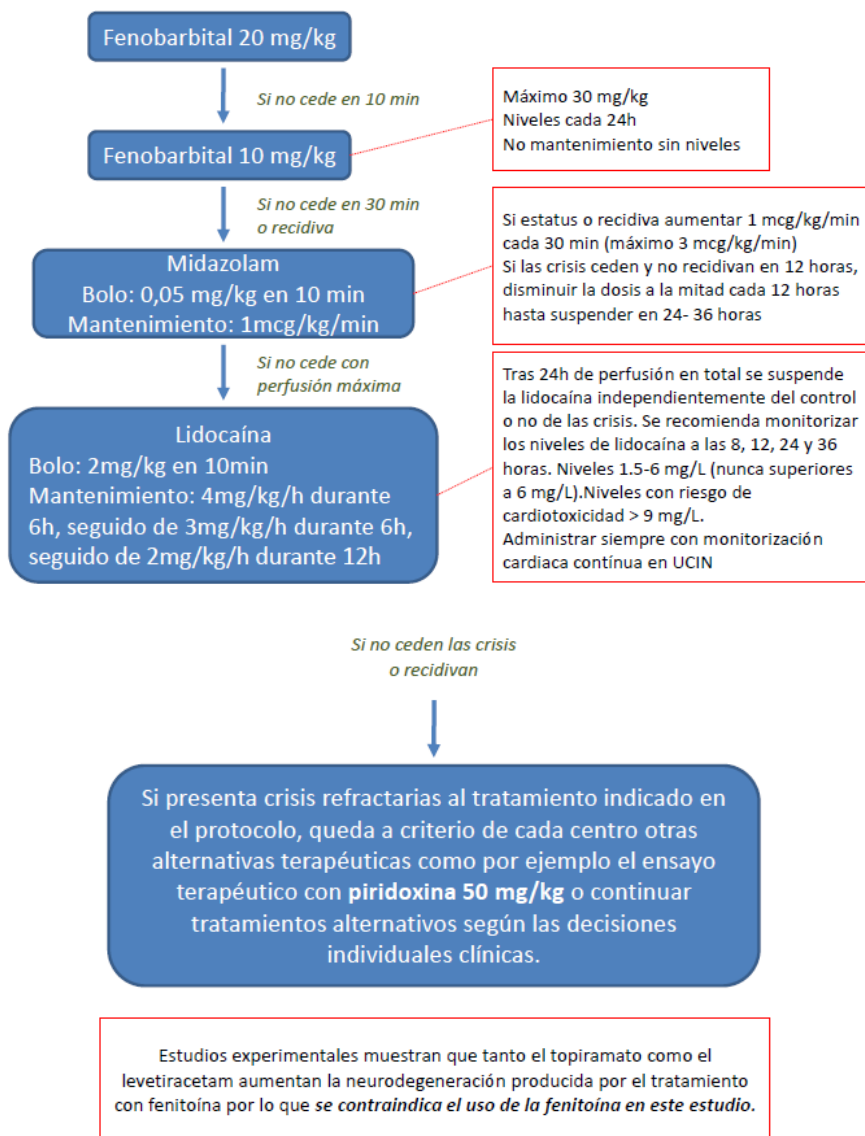


Figura 8. Tratamiento de las convulsiones.

4.3.10 Recalentamiento

El protocolo de recalentamiento que se siguió fue el que sigue a continuación:

- Recalentar lentamente en 12 horas ($< 0.3^{\circ}\text{C}$ por hora).
- El ascenso de temperatura se realizará de modo controlado aumentando 0.1°C cada 30 minutos hasta alcanzar la temperatura de 36.5°C .
- Si durante el recalentamiento aparecen convulsiones:
 - Detener el recalentamiento.
 - Volver a la temperatura de la fase de mantenimiento de la hipotermia (33.5°C rectal) y mantenerla durante 24 horas.
 - Tratar las convulsiones según protocolo.
 - Reiniciar el recalentamiento según el protocolo habitual.

4.4 Procedimientos del estudio y valoraciones. Recogida de variables

4.4.1 Variables prenatales

Factores de riesgo de asfixia perinatal: alteraciones de la monitorización fetal, líquido amniótico meconial, presencia de evento centinela (patología del cordón, desprendimiento de placenta, rotura uterina, hemorragia fetal grave), distocia de parto, pH de cuero cabelludo.

4.4.2 Variables perinatales

Edad gestacional, somatometría (peso, longitud y medida del perímetro craneal).

4.4.2.1 Relacionadas con el estado objetivo de afectación perinatal

Puntuación de Apgar, maniobras de reanimación utilizadas (soporte respiratorio, FiO_2 máxima, intubación, masaje cardíaco, administración de drogas), pH y déficit de bases en gasometría de cordón umbilical (arteria y/o vena).

4.4.2.2 Relacionadas con el estado clínico de evolución a EHI moderada/grave

Estado de vigilia (letargia, estupor, coma), hipotonía, respuestas motoras disminuidas, ausentes o estereotipadas, reflejos primitivos

alterados o ausentes, alteración del sistema autonómico, presencia de convulsiones.

4.4.3 Transporte neonatal crítico (si nacimiento en hospital comarcal)

Hipotermia pasiva, incidencias durante el transporte (sobreenfriamiento, hiperpirexia, convulsión, extubación).

4.4.4 Hipotermia

Se confeccionó un cuaderno de recogida de datos electrónico (CRDe). Las variables recogidas durante el tratamiento con hipotermia se han tomado de la historia clínica del paciente.

4.4.4.1 Variables clínicas basales

Temperatura rectal al ingreso, horas de vida al inicio de hipotermia activa, soporte respiratorio, sobreenfriamiento ($T^a < 32^{\circ}\text{C}$), hiperpirexia ($T^a \geq 38^{\circ}\text{C}$), arritmias (excepto bradicardia sinusal > 80 lpm), convulsiones clínicas (duración, número, frecuencia) y tipos (focales o generalizadas, tónicas, clónicas, tónico-clónicas, sutiles), oligoanuria, insuficiencia renal (creatinina > 1.5 mg/dL durante al menos 24 – 48 horas o un aumento > 0.3 mg/dL al día con función renal materna normal), complicaciones cutáneas.

Tratamientos: morfina, fentanilo, administración y dosis de fármacos antiepilépticos (fenobarbital, midazolam, lidocaína, etc.), inotropos, antibióticos, insulina.

4.4.4.2 Determinaciones analíticas basales

Trombopenia (plaquetas < 60.000/ μ L), creatinina, índice de Quick.

4.4.4.3 Electroencefalograma integrado por amplitud (aEEG)

Se monitorizó la actividad cerebral mediante aEEG para evaluar la variable principal del estudio. La monitorización continua con aEEG en la población de estudio está clínicamente indicada según estándares internacionales. Se inició la monitorización tan pronto como fue posible y se mantuvo durante 5 – 7 días en función de la disponibilidad de cada centro.

Se utilizó un aEEG de 1, 2 canales o multicanal en función de la disponibilidad del centro, colocándose los electrodos en el área central (C3 – C4) para monitores de un canal o en el área central – parietal (C3 – P3; C4 – P4) en el caso de dos canales.

La lectura y clasificación de trazados se realizó según la clasificación de reconocimiento visual de patrones¹⁴¹. La lectura del registro no se debe realizar dentro de los 30 minutos de la administración de medicación sedante y/o anticonvulsivante. Se anotó durante el registro si el paciente estaba con estas medicaciones. Se identificó el número de crisis/hora (aisladas,

repetidas o estatus) y la duración total de las convulsiones que se calculó como la suma de todo el tiempo en minutos.

Los registros fueron evaluados por 2 neonatólogos expertos cegados de la siguiente manera.

El aEEG se analizó para los siguientes periodos: 0 - 6 h, 6 – 24 h, 24 – 48 h, 48 – 72 h, recalentamiento, 72 – 96 h, 5 días, 6 días, 7 días; asegurando la evaluación, como mínimo, hasta 12 horas después del recalentamiento.

Se documentó lo siguiente:

- El trazado de base (continuo con ciclos vigilia – sueño, continuo sin ciclos vigilia – sueño, discontinuo, brote – supresión, continuo de bajo voltaje, plano).
- Número de crisis/hora (aisladas, repetidas, estatus).
- Duración de las crisis (minutos).
- Normalización del trazado de base: continuo de voltaje normal (horas de vida).
- Aparición de los ciclos vigilia – sueño (horas de vida).

4.4.4.4 Electroencefalograma convencional (multicanal)

La realización de un electroencefalograma convencional en la población de estudio está clínicamente indicada según estándares internacionales.

Se realizó un EEG convencional con 12 canales, si es posible, de 30 – 60 minutos de duración durante el tratamiento con hipotermia

y otro previo al alta. La lectura e interpretación del trazado se realizará por un neurofisiólogo o neurólogo pediátrico.

4.4.4.5 Productos de peroxidación

a) Recogida y toma de muestras

Se recogieron muestras de sangre y orina. Dada la naturaleza del estudio, se recomendó que las extracciones de las muestras de sangre se realizaran, en la medida de lo posible, coincidiendo con las muestras de sangre indicadas clínicamente evitando así más pinchazos en caso de no disponer de una vía central.

Para la recogida de orina se colocó un algodón estéril en el pañal para que se empapara, obteniéndose la orina absorbida en el algodón exprimiéndola con una jeringa de 10 mL. En el caso de que fuera portador de una sonda uretral, la orina se obtuvo directamente a través de esta.

Se recogieron muestras de sangre y orina. En el caso de la sangre (sangre de cordón umbilical, arterial o venosa) en los siguientes periodos de tiempo: a las 24 h, 48 h y 72 h de vida. En el caso de la orina en los siguientes periodos: primera orina, a las 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de vida.

b) Procesamiento de las muestras y almacenamiento (Figura 9)

Las indicaciones para el procesamiento de las muestras fueron las siguientes:

Sangre

- Extraer un volumen de sangre de 0.5 mL mediante jeringa heparinizada (Heparina sódica 1%). Después de su recogida, las muestras deben procesarse de forma rápida y mantenerse refrigeradas en todo momento (trabajar sobre hielo).
- Extraer 100 μL de sangre con una pipeta automática bien calibrada y añadir al vial blanco no etiquetado. Este vial ya contiene 10 μL de 100 mM N-etil-maleimida (NEM).
- Tras añadir la muestra, agitar durante 1 minuto.
- Añadir 110 μL de ácido perclórico (PCA) frío (4°C) al 8% para precipitación de las proteínas.
- Agitar.
- Centrifugar a 10000 G a 4°C durante 15 min (si no es posible refrigerar la centrífuga a 4°C , mantener unas condiciones de temperatura límites de $10\text{-}12^{\circ}\text{C}$ en la medida de lo posible).
- Recoger el sobrenadante, guardarlo en el vial blanco etiquetado y congelarlo a -80°C hasta el envío al laboratorio de perinatología.
- Centrifugar los 400 μL de sangre restantes a 1500 G a 4°C durante 10 minutos.
- Recoger el sobrenadante y alicuotarlo en los viales rojos.
- Congelar las muestras a -80°C hasta el envío al laboratorio de perinatología.

Orina

- Recoger un volumen mínimo de orina de 700 μL .
- Traspasar la muestra a los viales amarillos.
- Congelar inmediatamente a -80°C hasta su envío.

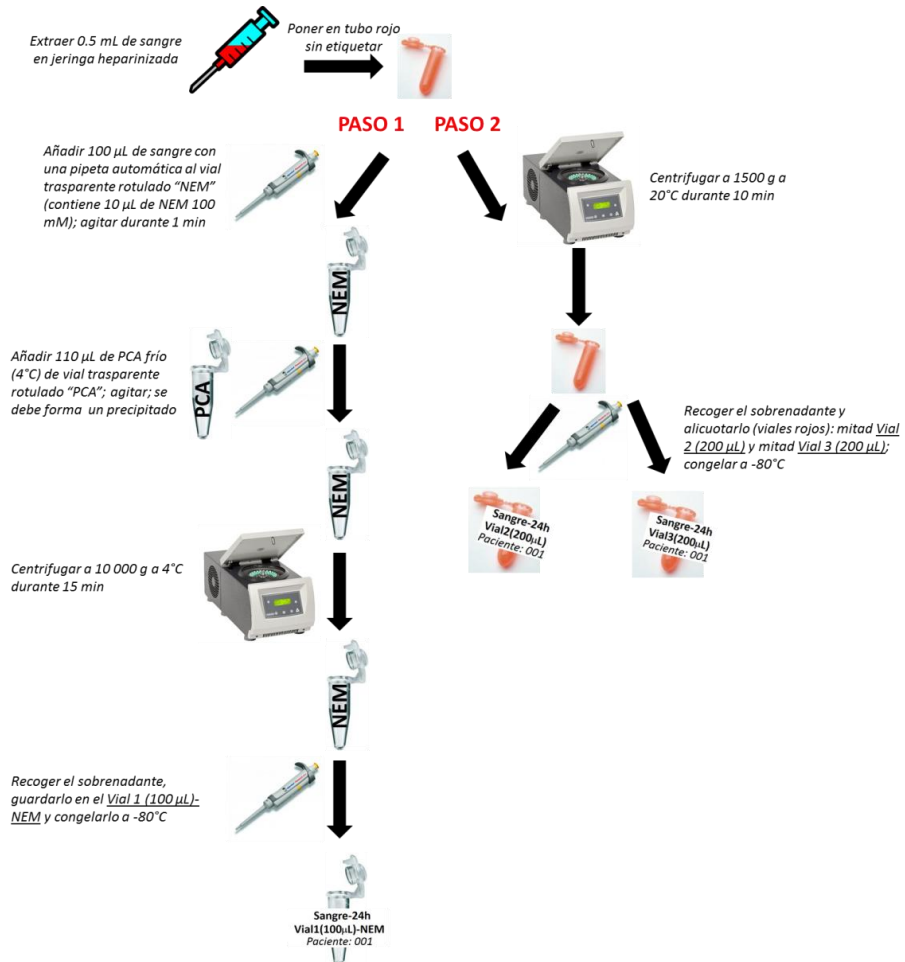


Figura 9. Esquema del procesamiento y almacenamiento de las muestras.

c) Etiquetado de las muestras

Las etiquetas de las muestras incluyeron lo siguiente (Figura 10):

- Número de identificación del paciente
- Número de vial.
- Tipo de muestra (sangre/orina)
- Tiempo de recogida.

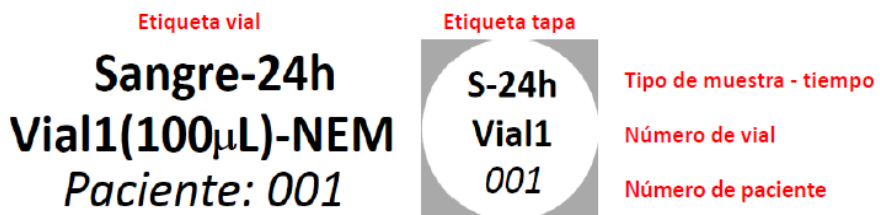


Figura 10. Etiquetado de las muestras.

d) Envío de las muestras

El envío de las muestras se realizó en hielo seco a través de un servicio de mensajería nacional.

e) Evaluación del metabolismo energético en plasma

La evaluación del metabolismo energético se realizó mediante la determinación de un panel de compuestos pertenecientes al ciclo de Krebs y de determinados cuerpos cetónicos mediante un método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) que fue desarrollado y validado para cuantificar de manera simultánea diferentes metabolitos empleando tan solo un volumen

de muestra de 50 μ L, permitiendo determinaciones seriadas de muestras de sangre de pequeño volumen. La validación del método se realizó siguiendo las recomendaciones de la FDA para la validación de métodos analíticos.

Se determinaron los siguientes metabolitos:

- Piruvato
- Lactato
- Acetoacetato
- β -hidroxibutirato
- Succinato
- Fumarato
- Malato
- α -cetoglutarato

Se compararon también los resultados de las muestras del estudio con un grupo control de muestras de plasma obtenidas de recién nacidos a término sanos después del nacimiento coincidiendo con la extracción de las pruebas metabólicas de cribado neonatal realizadas antes del alta hospitalaria. Estos recién nacidos no precisaron reanimación en el paritorio, tuvieron puntuaciones de Apgar normales y pH y déficit de bases normales en la gasometría de sangre de cordón. El procesamiento de estas muestras fue el mismo que se ha descrito anteriormente.

Antes del análisis de las muestras, estas se procesaron de la siguiente manera. Las muestras de plasma se descongelaron en hielo y se homogeneizaron en un mezclador de vórtice durante 30 segundos. Se añadió acetonitrilo frío al plasma. A continuación se

centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf[®], añadiéndose posteriormente las soluciones estándar. Las muestras y los estándares se evaporaron mediante un evaporador centrífugo. Los residuos secos se suspendieron en una solución de metoxiamina al 4%. Después se incubaron durante 90 minutos a 30 ° C en un termomezclador y se diluyeron una vez más con hexano quedando preparadas para el análisis en el cromatógrafo de gases.

f) Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo

Las determinaciones de biomarcadores de estrés oxidativo se realizaron mediante métodos basados en cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas tandem (UPLC-MS/MS). En total se realizaron: 1) biomarcadores indicativos de daño oxidativo a ADN y proteínas en orina; 2) biomarcadores de daño oxidativo a lípidos (peroxidación lipídica) en orina y; 3) biomarcadores de estado redox derivados de la ruta de la transulfuración en sangre. Todos estos métodos han sido desarrollados y validados en nuestro grupo siguiendo las exigentes directrices de las guías de validación analítica de la FDA ⁴⁵.

g) Biomarcadores de daño oxidativo a lípidos en orina

La cuantificación de un panel de 13 isoprostanoides e isofuranoides junto con 4 parámetros totales de peroxidación lipídica se llevó a cabo utilizando un sistema UPLC-MS Acquity-Xevo TQS de Waters (Milford, E.E.U.U) de la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia, España). Los parámetros instrumentales del análisis se encuentran descritos con todo detalle

en los trabajos de validación del método desarrollados por nuestro grupo en los últimos años.

Las concentraciones se normalizaron por el valor de creatinina en orina. Los valores de creatinina se midieron mediante el método de Jaffé modificado implementado en el KIT DetectX de Arbor Assays (Ann Arbor, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante después de una dilución 1: 20 de orina en H₂O.

4.4.4.6 Farmacocinética del topiramato

Las concentraciones de topiramato se midieron después de la primera dosis de topiramato a las 2, 4, 8, 12, 18 y 24 horas (antes de la segunda dosis), 48 horas (antes de la tercera dosis), 72 horas (antes de la cuarta dosis), 96 horas (antes de la quinta dosis), y 120 horas (antes de la sexta dosis). Las extracciones se interrumpieron después de 24 horas de la última dosis del fármaco.

a) Procesamiento y almacenamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras de sangre para la cuantificación de la concentración de topiramato se realizó de la siguiente manera:

- Extraer un volumen de sangre de 0,5 mL en tubo seco (sin anticoagulante)
- Centrifugar a 1500 G durante 5 minutos con el objetivo de garantizar la obtención de un mínimo de 150 µL de suero. Trasvasar al vial azul.

- Congelar la muestra a -20°C hasta su envío a la Unidad de Farmacocinética del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

b) Etiquetado de las muestras

Las etiquetas de las muestras incluyeron lo siguiente:

- Número de identificación del paciente
- Tiempo de recogida (tras administración de la primera dosis del fármaco y siguientes tal y como se ha explicado arriba).

El topiramato se determinó en las muestras de suero empleando el QMS[®] (“Quantitative Microsphere System”) Inmunoensayo de topiramato de Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite inferior de cuantificación de este método es de $1.5 \mu\text{g} / \text{mL}$.

El sistema de ensayo homogéneo de 2 componentes está basado en el principio de inmunoensayo de inhibición competitiva donde la droga libre de la muestra compite por los lugares de unión del anticuerpo con moléculas de droga recubiertas de micropartículas uniformes. El reactivo de micropartículas de droga recubierta se aglutina rápidamente en presencia del reactivo con el anticuerpo y en ausencia de cualquier droga en la muestra con la que competir. El cambio en la tasa de absorbancia se mide fotométricamente y es proporcional a la tasa de aglutinación de las micropartículas.

La configuración típica del kit reactivo es la siguiente:

Reactivo 1: anticuerpo específico para el fármaco.

Reactivo 2: micropartículas recubiertas del fármaco.

Cuando una muestra que contiene la droga se añade al reactivo del anticuerpo antes de la adición del reactivo con las micropartículas, la reacción de aglutinación se inhibe proporcionalmente a la concentración de droga en la muestra. Usando calibradores QMS[®] se puede obtener una curva clásica de inhibición de la aglutinación dependiente de la concentración. La tasa máxima de aglutinación corresponderá con una concentración mínima de droga y la tasa mínima de aglutinación corresponderá con una concentración máxima de droga.

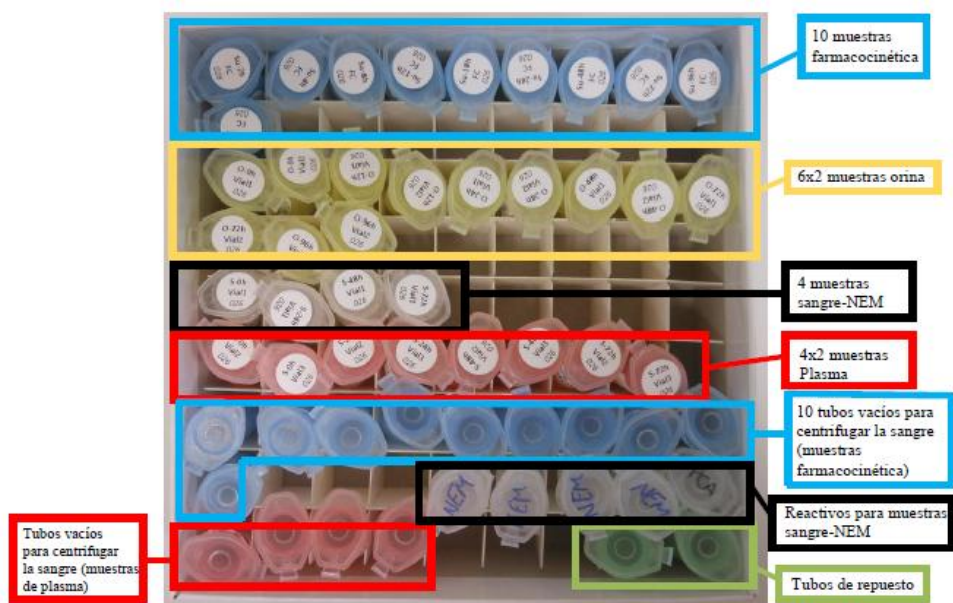


Figura 11. Muestra del interior de las cajas enviadas a los centros del estudio, con los tubos etiquetados, para el procesamiento y almacenamiento de las muestras de peroxidación y farmacocinética del topiramato.

4.4.4.7 Ecografía y Doppler cerebral

La realización de ecografías cerebrales seriadas en pacientes con encefalopatía durante el tratamiento con hipotermia está clínicamente indicada según estándares internacionales.

Se realizaron también para poder descartar otras entidades diferentes de la encefalopatía y se realizó una evaluación adicional basada en el índice de resistencia.

Los exámenes se realizaron el día 1 (previo o dentro de las 8 horas posteriores a la administración de la primera dosis de la medicación del estudio), a las 24 horas de vida (+/- 12 horas), a los 3-4 días de vida (tras el recalentamiento) y a los 7 días de vida (entre 6-8 días).

Se obtuvieron las siguientes imágenes en cada examen:

- seis imágenes coronales (C1-C6).
- cinco imágenes sagitales (S1-S5).
- una imagen mastoidea.
- un examen Doppler de la arteria cerebral anterior (ACA) indicando el pico sistólico y diastólico de la velocidad de flujo en la ACA que permita el cálculo del índice de resistencia.

En la base de datos se documentó lo siguiente:

- Velocidad de flujo sistólica máxima y diastólica final en la ACA para calcular el índice de resistencia como potencial predictor de la gravedad de la lesión cerebral.

- Hallazgos relacionados con la asfixia: edema, hiperecogenicidad de los ganglios basales, del tálamo y de la sustancia blanca periventricular, difusa o cortico-subcortical.
- Patología estructural y otras patologías: ventriculomegalia, hemorragia intracraneal, hemorragia talámica, infarto isquémico/hemorrágico, alteraciones de la fosa posterior (hemorragia cerebelosa), trombosis de los senos venosos.

4.4.4.8 Resonancia magnética cerebral

La realización de una resonancia magnética cerebral está clínicamente indicada en la población de estudio. Se realizará a los 7 días de vida (+/- 1 día).

Se incluyeron las siguientes secuencias:

- T1.
- T2.
- Difusión (DWI).
- Espectroscopia (altamente recomendable si está disponible).

Se indicó en la base de datos una evaluación general del examen de RM, como normal o patológica y se documentaron los siguientes puntos:

- Alteración de la sustancia blanca (difusa, periventricular, subcortical, infarto hemorrágico, infarto isquémico).
- Pérdida de diferenciación de la sustancia gris/blanca.
- Alteración cortical (cisura de Rolando, interhemisférica, ínsula, etc.).

- Alteración gangliotalámica.
- Pérdida de intensidad de la señal del brazo posterior de la cápsula interna.
- Alteración del troncoencéfalo.
- Alteración del cerebelo (hemorragia, isquemia, atrofia).
- Alteración de la señal del hipocampo.
- Hemorragia (epidural, subdural, subaracnoidea, intraventricular, etc.).
- Trombosis de senos venosos.
- Alteración del cuerpo calloso.
- Difusión: normal o patológica, coeficiente de difusión en la sustancia blanca periventricular/subcortical, región gangliotalámica.
- Espectroscopia: lactato, cociente lactato/N-acetil aspartato, lactato/creatinina, lactato/colina.

4.4.5 Evaluación del desarrollo neurológico a largo plazo

El desarrollo neurológico a largo plazo de los lactantes tras la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica en la época neonatal va a determinar su capacidad para llevar una vida independiente sin ayuda.

La evaluación se realizó a los 24 meses de edad e incluyó lo siguiente:

- Medidas antropométricas (peso, perímetro craneal, longitud o altura).

- Exploración neurológica por neonatólogo con experiencia en seguimiento del desarrollo neurológico. Se realizará una historia general básica y un examen físico y neurológico para determinar la presencia de parálisis cerebral.
- Escala de Bayley III.

Escala de Bayley III

Escala mental.

Escala cognitiva.

Escala lenguaje.

Comunicación receptiva.

Comunicación expresiva.

Escala psicomotora.

Escala motora.

Motricidad gruesa.

Motricidad fina.

Registro del
comportamiento.

Escala socio-emocional.

Escala de la conducta adaptativa.

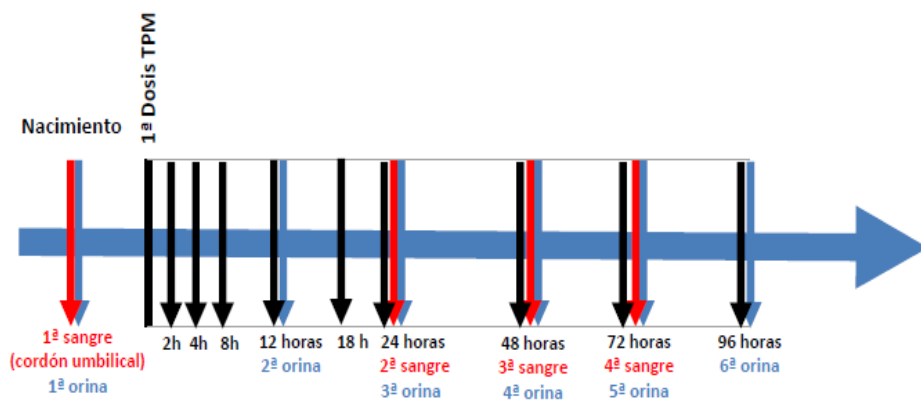
Inventario de observación del
comportamiento.

Tipos de puntuación

- Puntuaciones de escala (se derivan de las puntuaciones brutas totales de la subescala).
- Puntuaciones globales (se derivan de diversas sumas de las puntuaciones de escala de las subescalas).

- Puntuaciones percentiles (indica la posición de un niño con respecto a la de niños en la muestra de estandarización. Oscilan entre 1 y 99 siendo 50 la media y la mediana).

4.4.6 Resumen del protocolo del estudio (descripción de las visitas de estudio y tratamiento) (Figura 12)



- **Muestras para farmacocinética**
- **Muestras sangre estrés oxidativo**
- **Muestras orina estrés oxidativo**

Figura 12. Descripción de las visitas del estudio (no incluye ecografía cerebral ni seguimiento al alta, etc. que se detallan en la sección 7.1.5.7 y 7.1.6 respectivamente).

4.4.7 Descripción del proceso de estudio para un paciente concreto
(Figura 13)

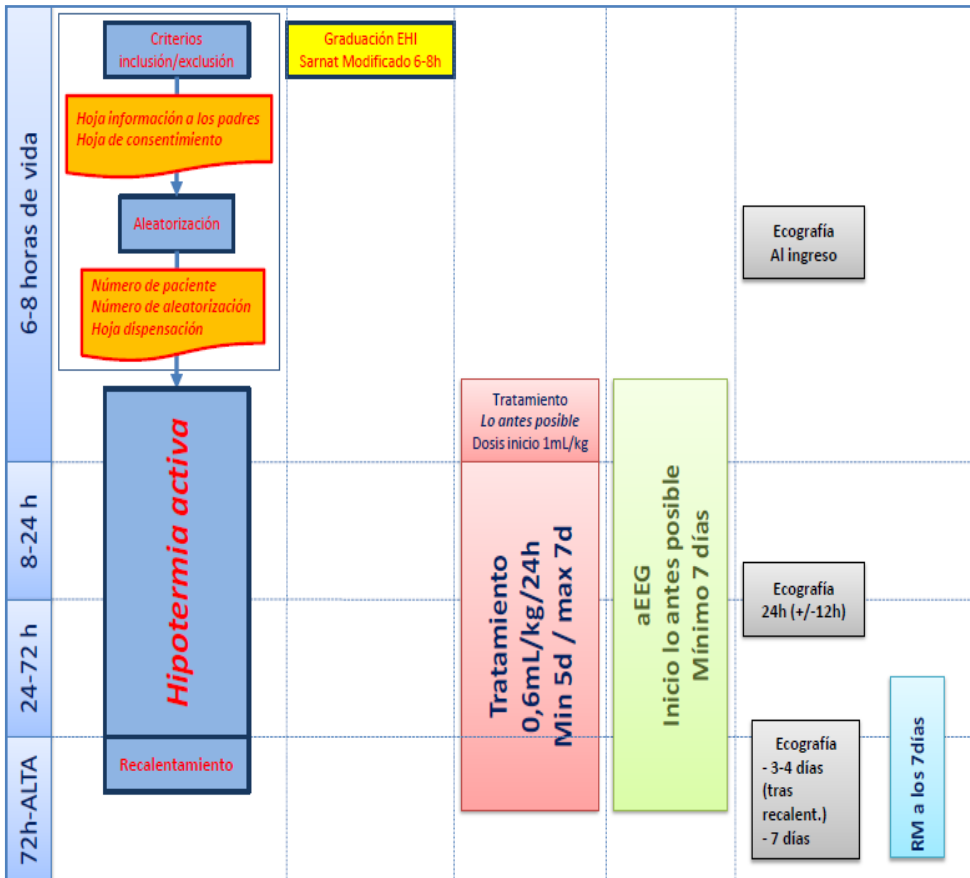


Figura 13. Diagrama de flujo que describe el proceso de estudio para un paciente.

4.4.8 Análisis de datos y métodos estadísticos

4.4.8.1 Entrada de datos

La base de datos fue diseñada por el grupo de trabajo de puesta en marcha del ensayo clínico y el CRDe fue diseñado por un informático, definiendo pruebas lógicas y de rango para minimizar los errores de entrada de datos. Se ha previsto la doble entrada de datos para tratar de evitar el sesgo de información. Se realizó un análisis de los datos por intención de tratar, esto es, todos los pacientes aleatorizados se analizaron como parte del grupo donde lo hicieron con independencia de los cambios posteriores.

Una vez cerrada la base de datos se realizó un proceso de depuración obteniendo la distribución de los valores para cada variable incluyendo los valores perdidos para valorar la calidad final de los datos y hacer las revisiones correspondientes.

4.4.8.2 Análisis de datos

- Objetivo principal

Para comprobar que la aleatorización fue adecuada se compararon las variables prenatales y perinatales de ambos grupos de tratamiento. Se valoró la presencia de confusión en aquellas variables que presentaban diferencias con $p \leq 0,20$ (Ji cuadrado para variables categóricas y comparación de medias con la prueba “*t-Student*” en el caso de variables continuas).

En el caso de que no existiera confusión se valoró la relación entre el topiramato/placebo y la incidencia de convulsiones asociadas a hipoxia-isquemia, calculando el riesgo relativo.

En el caso de que existiera confusión, se realizó un análisis ajustado incluyendo los confundidores que produjeran un cambio >10%.

- Objetivos secundarios

Los datos se expresaron utilizando la media y la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartílico en el caso de variables continuas y utilizando frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas.

La asociación entre el grupo de medicación (topiramato/placebo) y el tiempo total de convulsión se evaluó utilizando la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Las diferencias en actividad convulsiva entre los dos grupos fueron evaluadas utilizando un modelo de regresión ordinal incluyendo una interacción entre el grupo de tratamiento y el tiempo de hipotermia.

Las diferencias de supervivencia entre los dos grupos se evaluaron con la prueba de log-rank y se realizaron curvas de Kaplan-Meier.

La asociación entre la concentración de topiramato en suero a lo largo de las primeras 48 horas de vida y la actividad convulsiva fue evaluada utilizando un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales.

En el caso del modelo farmacocinético el análisis de los datos se realizó con el software NONMEM versión 7.3 (ICON Clinical Research LLC, Pennsylvania, USA).

Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$. Todo el análisis estadístico se realizó a través del programa R (versión 3.4.3).

4.4.9 Aspectos éticos y de validez interna

- Realización ética del estudio

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de los hospitales participantes. El ensayo se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de Principios Éticos para la Investigación Médica en Seres Humanos, así como con las directrices de Buena Práctica Clínica (BPC) de la Conferencia Internacional sobre Armonización y los requisitos legales pertinentes. Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado para la participación de sus hijos en el estudio tras la explicación adecuada del mismo.

- Monitorización y auditorías

Se realizaron visitas periódicas de monitorización durante el ensayo en todos los centros por un monitor externo totalmente ajeno al equipo investigador para asegurar que se estaba siguiendo el protocolo y las normas de BPC. Los monitores revisaron los documentos fuente para confirmar que los datos recogidos en el CRDe eran precisos.

5. Resultados

5.1 Reclutamiento

El periodo de estudio comprendió desde el 1 de abril de 2014 hasta el 31 de diciembre de 2016. Durante este periodo nacieron 180 pacientes con diagnóstico de encefalopatía hipóxico-isquémica susceptibles de incluirse en el estudio. Dado que una parte importante de los nacimientos se produjeron en hospitales de segundo nivel y tenían que ser trasladados a los hospitales de tercer nivel para tratamiento con hipotermia y aleatorización, uno de los motivos de pérdida de reclutamiento fue la llegada a los hospitales de referencia más allá de las 8 horas de vida. Además, 16 casos rechazaron participar en el ensayo y 54 no se pudieron aleatorizar por diferentes motivos, entre ellos, la situación clínica del paciente, llegada de los familiares al hospital de referencia más tarde que el paciente con imposibilidad de informar del ensayo, no disponibilidad de la medicación del ensayo, etc, por lo que finalmente 110 fueron aleatorizados. Un paciente en el grupo placebo y tres pacientes en el grupo topiramato fueron excluidos del análisis posterior, por lo que finalmente se incluyeron 106 pacientes en el análisis. El motivo de la exclusión del análisis en el grupo placebo fue una violación del protocolo, mientras que en el grupo topiramato se excluyeron por violación del protocolo, malformación del SNC y uno a petición del investigador por la situación clínica del paciente. En la Figura 14 se esquematiza el diagrama de flujo de pacientes.

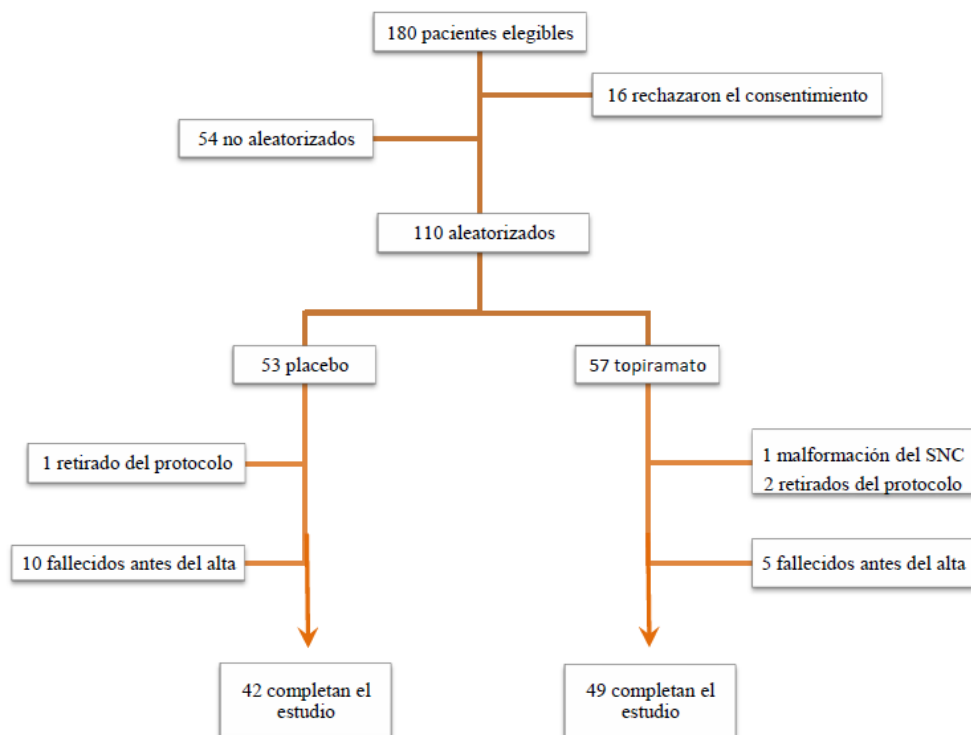


Figura 14. Diagrama de flujo de pacientes

5.2 Comprobación de la aleatorización

Las principales variables maternas y perinatales se resumen en la Tabla 1 mientras que las características neonatales, maniobras de reanimación y variables de situación clínica a su llegada a su ingreso en la UCIN se muestran en la Tabla 2. Se comprueba así que la aleatorización fue efectiva ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a las variables de riesgo.

Tabla 1. Comparación de variables maternas y perinatales de riesgo en pacientes con EHI tratados con hipotermia más topiramato o placebo.

Variabes	Topiramato (N=54)	Placebo (N=52)	p
Edad materna (años)	34.2 (6.2)	31.2 (4.8)	0.05
Diabetes gestacional N (%)	6 (11.1)	6 (11.5)	NS
Hipertensión, preeclampsia N (%)	5 (9.3)	3 (5.8)	NS
Fiebre materna N (%)	7 (13.2)	1 (2)	NS
Corioamnionitis N (%)	3 (5.7)	1 (2)	NS
Edad gestacional (semanas)	39 (1.6)	38.7 (1.8)	NS
Líquido meconial N (%)	22 (40.7)	15 (31.2)	NS
Horas de bolsa rota	8.5 (11.6)	5.7 (9.8)	NS
Tipo de parto N (%)			
Vaginal	11 (20)	5 (9.6)	NS
Vaginal instrumentado	13 (24)	12 (23)	NS
Cesárea urgente	30 (55.6)	35 (67.3)	NS
Tipo de anestesia N (%)			
Epidural	22 (66.7)	18 (60)	NS
General	11 (33.3)	12 (40)	NS
Embarazo múltiple N (%)	3 (5.8)	3 (5.8)	NS
Evento centinela N (%)	29 (53.7)	35 (67.3)	NS
Anomalías del cordón N (%)	3 (6.2)	3 (6.4)	NS
Rotura uterina N (%)	2 (4.2)	4 (8.5)	NS
Desprendimiento de placenta N (%)	5 (10.4)	9 (19.1)	NS
Distocia de hombros N (%)	12 (25)	11 (23.4)	NS
Estado fetal poco tranquilizador N (%)	38 (71.7)	38 (77.6)	NS

Los datos se expresan como media (desviación estándar)

Tabla 2. Comparación de variables neonatales, maniobras de reanimación y situación clínica a su llegada a UCIN en pacientes con EHI tratados con hipotermia más topiramato o placebo.

VARIABLES	Topiramato (N=54)	Placebo (N=52)	p
Peso al nacer (gramos)	3250 (720)	3100 (770)	NS
Longitud (cm)	51 (3)	50 (3)	NS
Perímetro cefálico (cm)	34.4 (1.5)	34.2 (2)	NS
Varón N (%)	30 (55.7)	28 (54)	NS
Apgar 1 minuto	2 (1-2)	1 (0-3)	NS
Apgar 5 minutos	4 (2-5)	3 (2-4)	NS
Apgar 10 minutos	5 (3-7)	5 (4-6)	NS
Recién nacidos trasladados N (%)	36 (68)	41(79)	NS
Ventilación con presión positiva N (%)	53 (98.2)	51 (98.1)	NS
Intubación en paritorio N (%)	47 (88.7)	49 (94.2)	NS
Masaje cardíaco N (%)	26 (48.1)	30 (58.8)	NS
Adrenalina N (%)	20 (37)	29 (55.8)	NS
FiO ₂ máxima	0.85 (0.26)	0.8 (0.32)	NS
Sangre de cordón umbilical			
pH	6.98 (0.2)	6.93 (0.2)	NS
pCO ₂ (mmHg)	71.1 (34.4)	68.8 (30)	NS
Exceso de bases (mmol/L)	14 (5.1)	15 (9.8)	NS
Temperatura al ingreso en UCIN (°C)			
RN en hospital Hypotop (N=28)	34.6 (1.46)	35.1 (1.2)	NS
RN trasladados (N=78)	33.7 (1.1)	33.3 (1.4)	NS
Encefalopatía moderada N (%)	37 (68.5)	33 (63.5)	NS
Encefalopatía grave N (%)	17 (31.5)	19 (36.5)	NS
Horas de vida al inicio de hipotermia activa			
RN hospital Hypotop	2.46 (1.6)	2.66 (1.9)	NS
RN trasladados	4.94 (1.4)	4.76 (1.2)	NS

Los datos se expresan como media (desviación estándar), excepto el Apgar que se expresa en mediana (rango).

5.3 Objetivo principal

19 de 49 (45,2%) pacientes en el grupo topiramato y 23 de 48 (54,8%) en el grupo placebo presentaron convulsiones durante el periodo de estudio. Tras realizar el análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de convulsiones entre ambos grupos ($p=0,364$). Se realizó también el análisis de la incidencia por periodos de monitorización del aEEG, de manera que en las primeras 24 horas tras el inicio de la monitorización la incidencia de actividad convulsiva en el grupo topiramato fue menor que en el grupo placebo aunque el resultado no fue estadísticamente significativo (topiramato vs. placebo: 14 (25,9%) vs. 22 (42%); $p =0,221$). Pensamos inicialmente en un error de aleatorización por haber más EHI graves en el grupo placebo pero como hemos observado anteriormente no se encontraron diferencias de porcentaje de EHI moderada o grave entre ambos grupos. En el resto de periodos analizados no se encontraron diferencias (ver Tabla 3).

Tabla 3. Incidencia de convulsiones registradas durante la monitorización del aEEG en pacientes con EHI tratados con hipotermia más topiramato o placebo.

Horas desde el inicio de la monitorización	Topiramato (N=49)	Placebo (N=48)
	Convulsiones N (%)	
0-24	14 (25.9)	22 (42)
24-48	8 (14.8)	6 (12)
48-72	3 (5.8)	3 (6.4)
72-96	3 (5.9)	2 (4.4)

Se analizó también el objetivo principal en el grupo de fallecidos, no encontrándose diferencias en la incidencia de convulsiones entre ambos grupos ($p=0,545$).

5.4 Objetivos secundarios

5.4.1 Duración y/o frecuencia de las convulsiones

La mediana de la duración de las convulsiones en el grupo topiramato fue de 40 (108) minutos mientras que en el grupo placebo fue de 24,4 (62,4) minutos (Figura 15). Tras la realización del análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la duración ni en la frecuencia ni en el tipo de

convulsiones entre ambos grupos. Tampoco se encontraron en los diferentes periodos de monitorización del aEEG (ver Tabla 4).

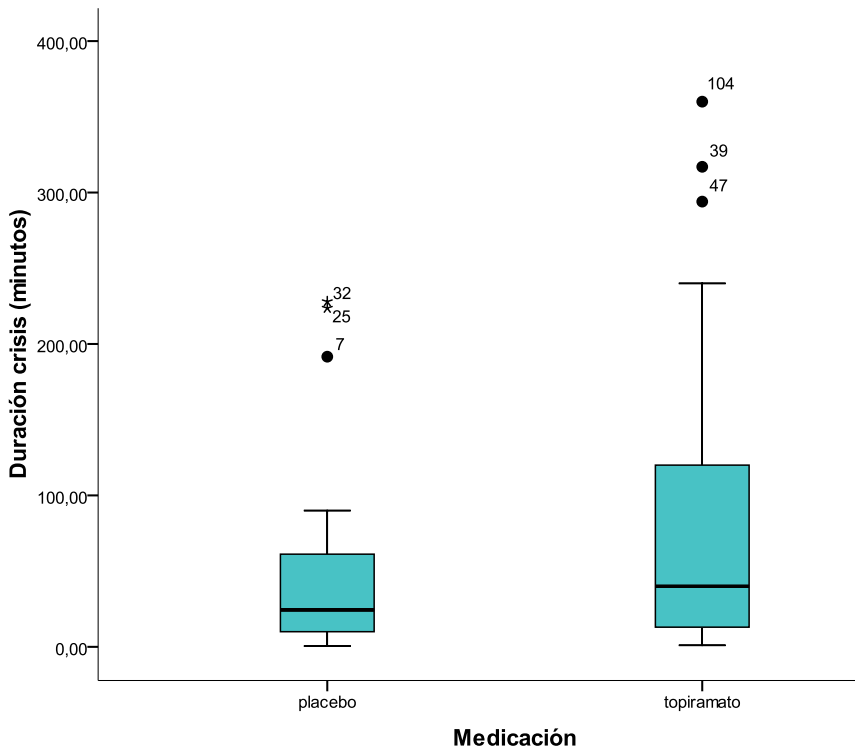


Figura 15. Mediana y rango intercuartil de la duración de las convulsiones en el grupo topiramato y placebo.

Tabla 4. Duración, frecuencia y características de las convulsiones registradas durante la monitorización del aEEG en pacientes con EHI tratados con hipotermia más topiramato o placebo.

	Placebo (N=48)				Topiramato (N=49)			
	Convulsiones	Tipo de convulsiones (%)			Convulsiones	Tipo de convulsiones (%)		
Horas desde el inicio de la monitorización	Duración (min)	Aisladas (%)	Repetidas (%)	Estatus (%)	Duración (min)	Aisladas (%)	Repetidas (%)	Estatus (%)
24 horas	12.01	47.5	38.0	14.2	14.8	37.2	37.2	24.8
48 horas	6.95	50	16.7	3.,3	10.47	30	50	20
72 horas	2.36	66.7	0	33.3	6.58	25	75	0
96 horas	0.59	50	50	0	0.48	40	60	0
5 días	0.82	33.3	33.3	33.3	2.09	50	25	25
6 días	0.35	0	100	0	1.29	33.3	33.3	33.3
7 días	1.48	100	0	0	0.09	33.3	66.7	0

Los datos de duración (min) se expresan como media

Se analizó también este objetivo secundario en el grupo de los fallecidos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la duración de las crisis convulsivas entre ambos grupos ($p=0,548$).

5.4.2 Incidencia de mortalidad neonatal

La mortalidad fue mayor en el grupo placebo que en el grupo topiramato (10 (19.2%) vs 5 (9.2%)). El estudio de la mortalidad se muestra en el siguiente gráfico de Kaplan-Meier y no reveló diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,123$) (Figura 16).

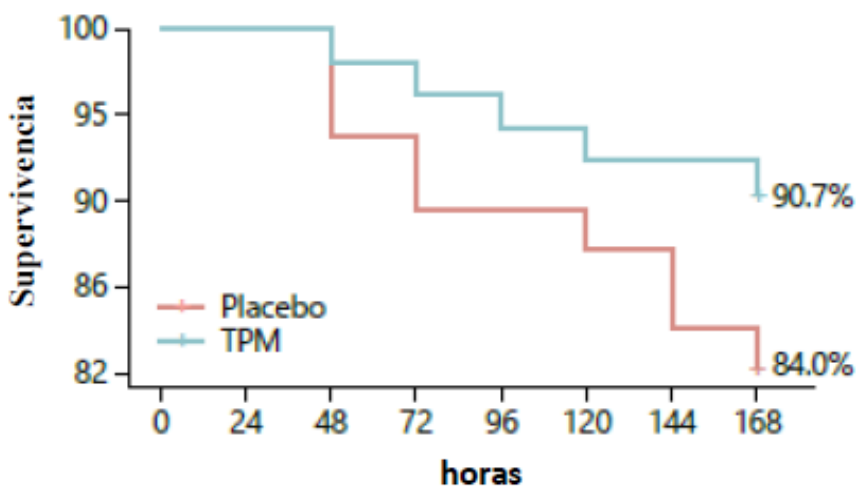


Figura 16. Análisis de supervivencia.

5.4.3 Productos de peroxidación

Evaluación del metabolismo energético

Se analizaron un total de 194 muestras de plasma pertenecientes a los pacientes con EHI moderada/grave incluidos en el estudio, obtenidas en los diferentes periodos de tiempo. La Figura 17 muestra las concentraciones de diferentes metabolitos en diferentes tiempos. Mientras que algunos metabolitos como el acetoacetato, el succinato, el fumarato y el α -cetoglutarato permanecieron constantes durante los tres primeros días de vida, otros mostraron cambios significativos con el tiempo. En consecuencia, las concentraciones de lactato, piruvato y β -hidroxibutirato disminuyeron, mientras que se observó un aumento de la concentración de malato. Al comparar las concentraciones de metabolitos de recién nacidos con EHI tratados con TPM o placebo

en los diferentes periodos de tiempo, no se observaron diferencias significativas a las 24 h, 48 h o 72 h después de la administración de la primera dosis de topiramato (Figura 18). Además, al comparar las concentraciones de metabolitos de las muestras del estudio a las 48 horas de administración de la medicación con las muestras de plasma del grupo control de recién nacidos a término sanos sin EHI (N=19), obtenidas a las 53 ± 13 horas tras el nacimiento, se encontraron niveles significativamente más bajos de piruvato y lactato en las muestras del grupo control, mientras que los niveles de acetoacetato y β -hidroxibutirato se incrementaron de manera significativa (ver Tabla 5).

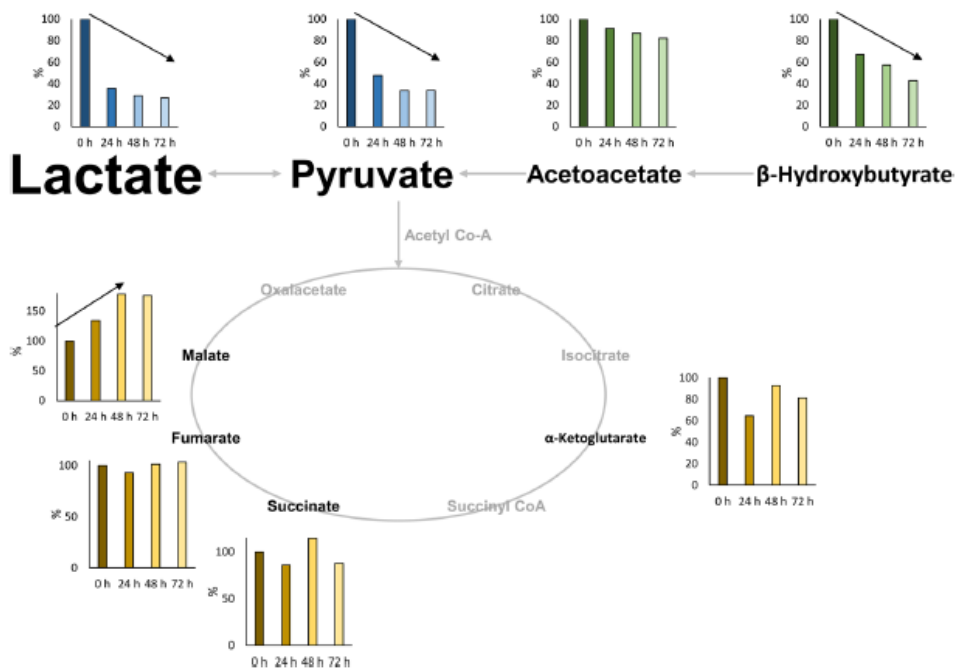


Figura 17. Cambios relativos de metabolitos en función de la edad de todos los recién nacidos con EHI tratados con hipotermia más topiramato/placebo. Valores expresados en mediana como medida relativa a la mediana en tiempo 0; las flechas indican tendencias.

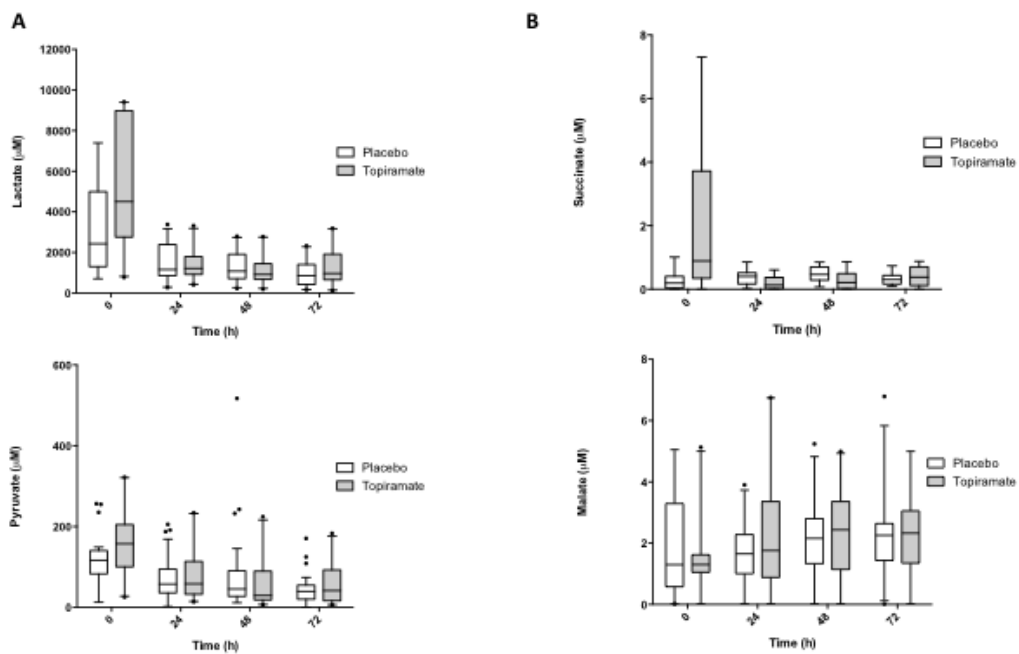


Figura 18. Representación de la mediana (IC 25%-75%) de los valores plasmáticos de metabolitos relacionados con la energía (A) y metabolitos del ciclo de Krebs (B) en los diferentes periodos de tiempo de estudio.

Tabla 5. Concentraciones de diferentes metabolitos ($\mu\text{mol/L}$) en muestras de plasma del grupo control ($N = 19$) comparados con los recién nacidos con EHI tratados con hipotermia terapéutica más topiramato/placebo 48h después de la administración de la primera dosis de topiramato/placebo.

Metabolite	Control Group				HYPOTOP (48 h)				p-value
	Range P ₁₀ -P ₉₀	Median	Mean \pm s	>LLOQ (%)	Range P ₁₀ -P ₉₀	Median	Mean \pm s	>LLOQ (%)	
Pyruvate	6-50	11	100 \pm 200	100	12-200	40	100 \pm 200	100	1.6×10^{-5}
Lactate	300-1000	700	700 \pm 400	100	500-3000	1000	1600 \pm 2000	100	0.002
Acetoacetate	20-700	100	300 \pm 300	100	0.7-30	7	35 \pm 130	82	1.7×10^{-8}
β -Hydroxybutyrate	13-700	150	300 \pm 300	100	4-15	8	9 \pm 5	100	4.9×10^{-8}
Succinate	0.13-0.7	0.3	0.4 \pm 0.3	95	0.11-0.8	0.5	0.4 \pm 0.2	100	0.235
Fumarate	0.5-1.1	0.7	0.7 \pm 0.2	79	0.3-1.3	0.6	0.8 \pm 0.8	100	0.234
Malate	1.0-8	1.2	3 \pm 4	100	0.7-5	2	3 \pm 4	92	0.535
α -Ketoglutarate	0.5-2	1.2	1.3 \pm 0.6	74	0.02-7	1.2	2 \pm 4	81	0.672

LLOQ: “lower limit of quantification”

Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo

Se analizaron diferentes biomarcadores de peroxidación lipídica (isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos y neurofuranos) en orina 24 horas después del recalentamiento, no observándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los biomarcadores estudiados entre ambos grupos (Figura 19).

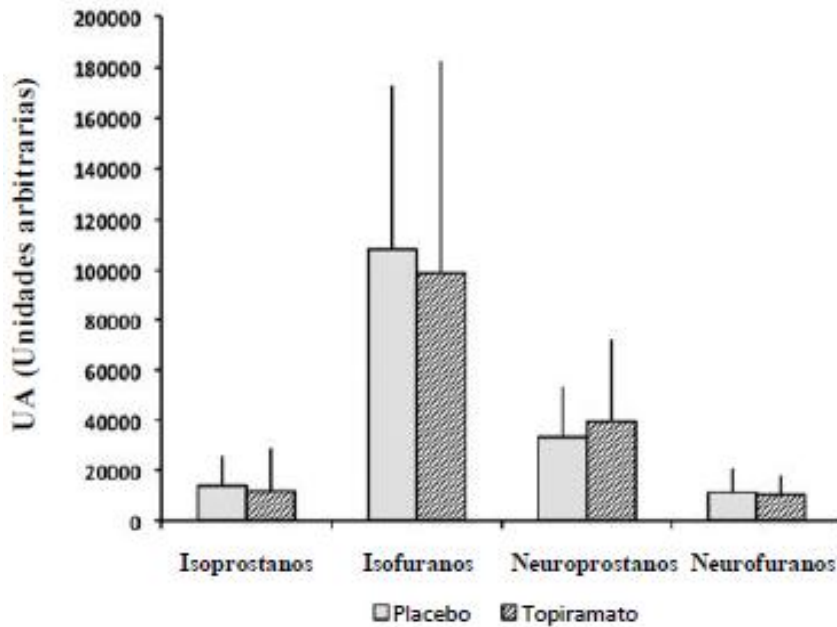


Figura 19. Representación de la media (DE) de los metabolitos de peroxidación lipídica isoprostanos e isofuranos, y neuroprostanos y neurofuranos específicos de la peroxidación lipídica cerebral en recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica tratados con hipotermia terapéutica y aleatorizados a topiramato o placebo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los biomarcadores.

5.4.4 Farmacocinética y farmacodinámica del topiramato

Del total de los 54 pacientes que recibieron tratamiento con topiramato únicamente se pudieron recuperar las muestras de 52 pacientes, determinándose un total de 451 muestras de suero.

Se observó un aumento progresivo de la media de las concentraciones séricas a medida que el régimen de dosificación

progresó, alcanzándose aparentemente una situación de estabilidad con la cuarta dosis, ya que prácticamente se obtuvo la misma concentración mínima en suero a las 96 y a las 120 h (Figura 20).

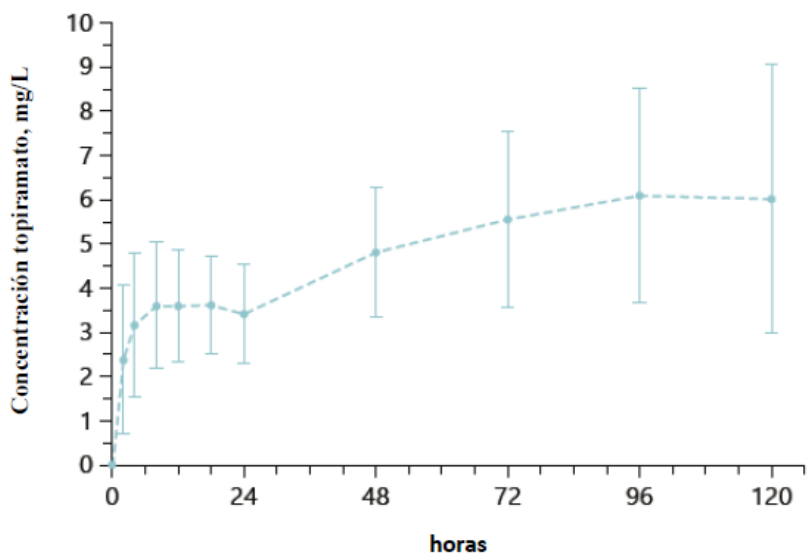


Figura 20. Evolución de la concentración sérica de topiramato (media +/- DE) en los diferentes tiempos de estudio.

Todos los pacientes que recibieron topiramato estaban dentro del rango de seguridad ¹⁴². Sin embargo, el rango terapéutico de 5–20 mg/L, anteriormente descrito por Patsalos y colaboradores ¹⁴² únicamente se alcanzó en 7/46 pacientes (15,2%) a las 24 h, 20/49 pacientes (40,8%) a 48 h, 33/48 pacientes (68,7%) a las 72 h y 34/45 pacientes (75,6%) a las 96 h (Figura 21).

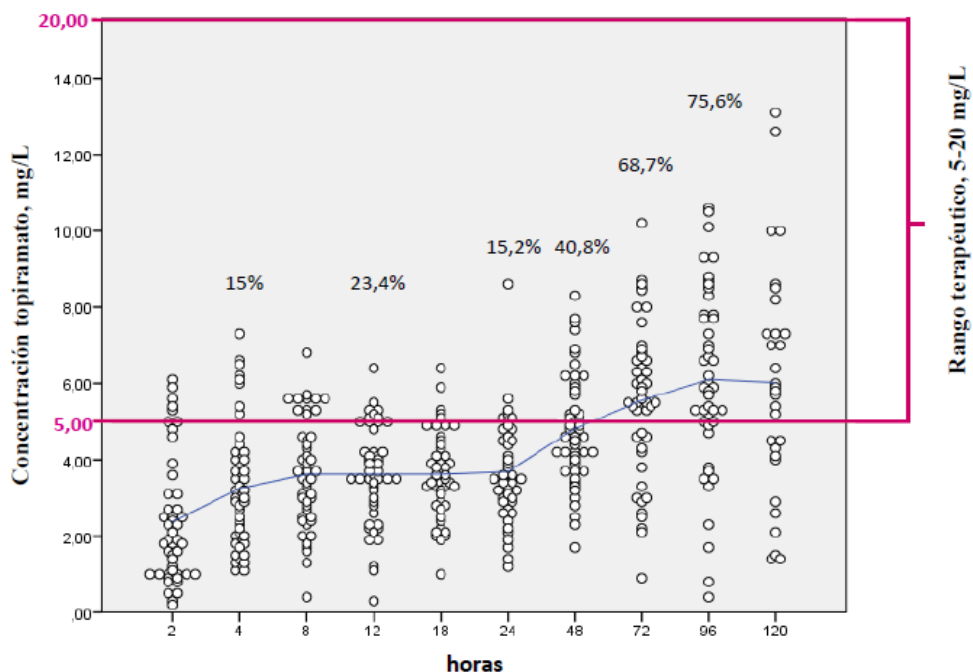


Figura 21. Concentraciones séricas de topiramato desde el inicio del tratamiento hasta el 5° día de vida (2 días tras finalizar hipotermia). El rango terapéutico se encuentra entre las líneas horizontales moradas entre 5-20 mg/L. Se muestra el porcentaje de pacientes que alcanzaron el rango terapéutico a las 4, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la primera dosis.

- Modelo farmacocinético

Se utilizó un modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden y dos aclaramientos diferentes, uno para el período de hipotermia (CL1: 0-72 h) y otro para el período de posthipotermia (CL2:72-120 h) para describir los datos de concentración de topiramato en el tiempo. Los parámetros estimados del modelo fueron: constante de absorción k_a (h^{-1}) 3.34×10^{-1} , CL_1 (L/h) 4.17×10^{-2} , CL_2 (L/h) 5.04×10^{-2} y volumen de

distribución (L) 3.22. El modelo fue capaz de detectar un incremento del 20,8% en el aclaramiento del topiramato tras el recalentamiento de los pacientes.

Se incluyeron un total de 168 eventos convulsivos del grupo topiramato y placebo en un análisis de tiempo repetido hasta el evento. La probabilidad experimental de convulsiones se muestra en la Figura 22A. Un modelo de referencia exponencial con riesgo decreciente de episodios de convulsiones a lo largo del tiempo fue capaz de describir adecuadamente los eventos observados aunque la influencia de la administración de topiramato no resultó en una diferencia significativa en la probabilidad de convulsiones durante el período de tiempo estudiado. La Figura 22B representa la comprobación visual del modelo predictivo final, mostrando la capacidad del modelo exponencial para predecir los eventos de convulsión observados para cada categoría.

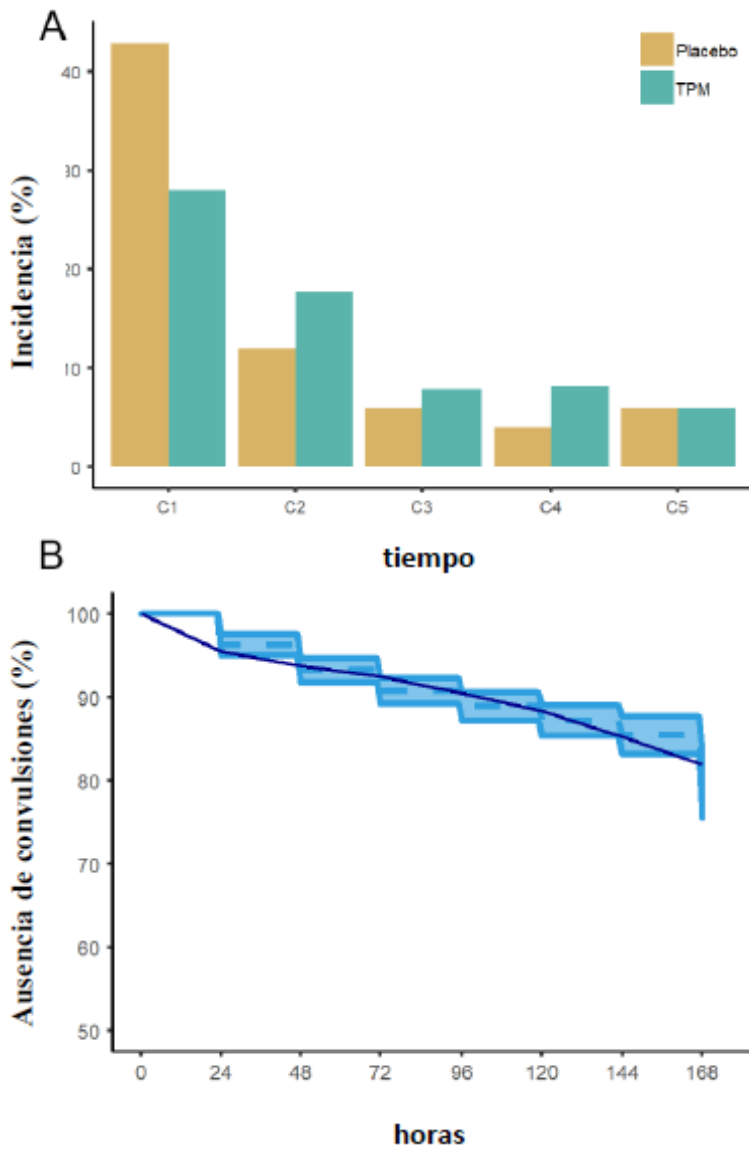


Figura 22. A. Incidencia de convulsiones en el grupo topiramato y placebo. TPM: topiramato. B. Comprobación visual del modelo predictivo. La línea azul continua representa la mediana de los datos observados, mientras que el área sombreada en azul representa el intervalo de predicción del 95% calculado.

Aunque la disminución de la frecuencia de las convulsiones durante las primeras 24 h en el grupo topiramato no fue estadísticamente significativa (Figura 22A), esta disminución podría sugerir cierto efecto del medicamento, puesto que las dosis fueron bajas. Por lo tanto, se evaluaron diferentes regímenes de dosificación para lograr una alta proporción de pacientes dentro del rango terapéutico aceptado. Las simulaciones se realizaron utilizando diferentes valores de peso de los recién nacidos incluidos en el estudio. Las simulaciones se implementaron asumiendo el régimen de dosificación original, es decir, la dosis oral inicial de 5 mg/kg y cuatro dosis consecutivas de 3 mg/kg y regímenes de dosificación alternativos. Se seleccionó un régimen de dosificación alternativo de acuerdo con el criterio de predicción de las concentraciones séricas máximas de topiramato para cada ciclo dentro del intervalo de 12-20 mg/L, siendo estos valores la media y el límite superior del rango terapéutico aceptado de las concentraciones séricas de topiramato respectivamente. Este régimen de dosificación alternativo consistió en una dosis de carga de 15 mg/kg para la dosis inicial y dosis de mantenimiento de 5 mg/kg para los días consecutivos. La Figura 23 muestra el pronóstico de las concentraciones de topiramato para recién nacidos con pesos corporales en el medio y en los extremos del rango del peso.

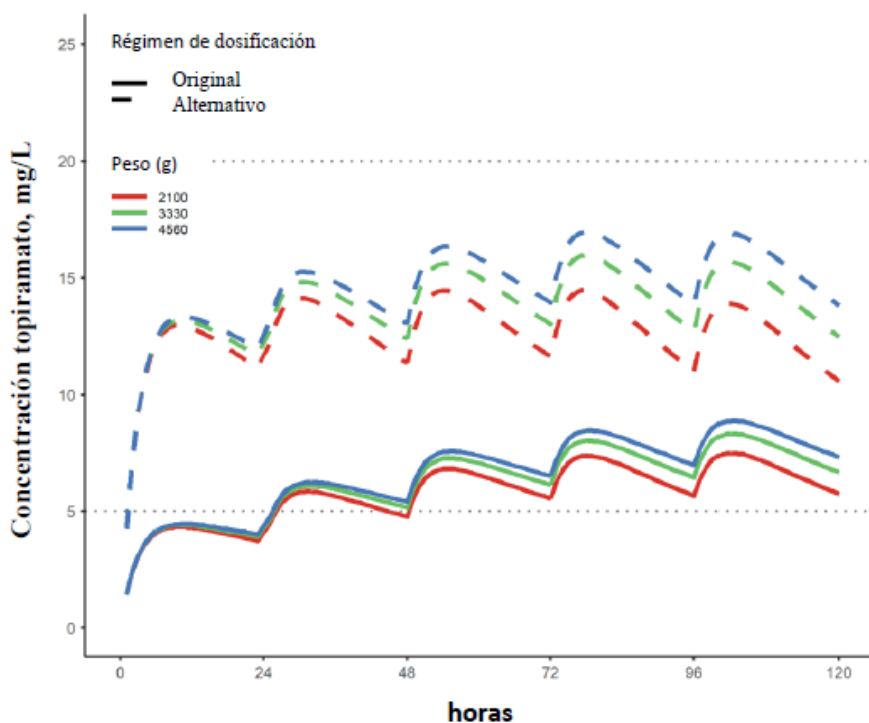


Figura 23. Simulaciones utilizando la dosificación original y alternativa considerando diferentes pesos (2100, 3330 y 4560 g). Las líneas discontinuas horizontales representan el intervalo terapéutico aceptado (5-20 mg/L).

5.4.5 Resonancia magnética cerebral

La resonancia magnética cerebral se realizó en 50 pacientes del grupo topiramato (92,6%) y en 43 pacientes del grupo placebo (86%). La resonancia fue informada como patológica en el 58% del grupo topiramato y en el 60,5% del grupo placebo, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,2$).

6. Discusión

6.1 Objetivo principal

Los fármacos anticonvulsivantes son esenciales para el control de la actividad convulsiva. Los cambios sinápticos y celulares producidos como consecuencia de la deprivación aguda de energía por isquemia cerebral aguda son similares a los desencadenados por la descarga neuronal anormal inducida por las convulsiones, pudiendo comprometerse el metabolismo energético neuronal y potencialmente empeorando la lesión cerebral isquémica aguda, en caso de convulsiones prolongadas o repetidas. En recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia las convulsiones se asocian con alteración del metabolismo cerebral y se ha demostrado que la presencia de crisis convulsivas se asocian con la gravedad de la lesión cerebral y la ausencia de crisis se asocia a tasas más bajas de muerte y discapacidad ¹²⁶⁻¹²⁸.

Por ello, la búsqueda de fármacos anticonvulsivantes se ha convertido en uno de los puntos más importantes en la investigación de terapias coadyuvantes a la hipotermia.

El topiramato es un fármaco antiepiléptico que inhibe la excitabilidad neuronal a través del bloqueo de los receptores de glutamato ^{114,115}. Además, entre otros efectos, tiene la capacidad de bloquear los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje ¹⁰⁸⁻¹¹³. La excitotoxicidad es uno de los mecanismos celulares descritos de muerte neuronal en la lesión cerebral hipóxico-isquémica ²⁵⁻²⁸. Por todas estas características el topiramato ha sido

uno de los primeros anticonvulsivantes en plantearse como estrategia neuroprotectora en casos de EHI.

En modelos animales experimentales se ha demostrado el efecto neuroprotector del topiramato ¹⁴. Se ha detectado que la administración de topiramato inmediatamente tras el insulto hipóxico-isquémico en ratas neonatales disminuye la lesión de sustancia blanca y los déficits motores asociados ¹¹⁵ y también se ha demostrado que mejora el desempeño funcional y la gravedad de la patología cerebral en ratas en combinación con hipotermia en un modelo de hipotermia post hipoxia-isquemia ¹¹⁷.

Además se ha utilizado de manera segura, desde el punto de vista clínico, en el periodo neonatal ^{120,143,144}. Uno de los efectos más importantes del topiramato se basa en la atenuación de la liberación de aminoácidos excitatorios posteriormente a la despolarización ¹⁴⁵. En un estudio reciente, el uso de topiramato a dosis de 10 mg/kg/día durante 3 días, conjuntamente con la hipotermia terapéutica, en pacientes con EHI moderada/grave no redujo la mortalidad ni mejoró el neurodesarrollo a los 18-24 meses; sin embargo, redujo significativamente la actividad convulsiva ¹⁴⁴. Glass y colaboradores también han descrito la eficacia del topiramato utilizando dosis similares; sin embargo, el aumento de la dosis a 25 mg/kg/día no incrementó la eficacia del topiramato ¹⁴³. No obstante, la información referente al uso del topiramato para el control de la actividad convulsiva en el período neonatal en el momento en que nuestro estudio fue planeado era muy limitado. En ese momento únicamente había un estudio de seguridad realizado

en Italia con un pequeño número de pacientes y sin datos de seguimiento a largo plazo ¹²⁰. Los autores confirmaron que: " Los efectos a largo plazo sobre las funciones cognitivas de la administración temprana del topiramato aún no se han evaluado" ¹²⁰. La hipotermia terapéutica disminuye la actividad del complejo enzimático hepático CYP3A4 encargado de metabolizar el topiramato, aumentando los niveles terapéuticos ¹⁴⁶. Por todo ello y, dada la falta de experiencia en el período neonatal y la falta de información sobre los efectos a largo plazo del topiramato, decidimos reducir la dosis de carga a 5 mg/kg y la dosis de mantenimiento a 3 mg/kg/día durante un total de 5 días para evitar posibles efectos secundarios imprevistos e indeseables.

Con la pauta de dosificación utilizada, solo en el 15,2% de nuestros pacientes se alcanzaron niveles terapéuticos en suero en las primeras 24 horas de hipotermia mientras que en el 40,8% alcanzaron niveles a las 48 horas, durante el tiempo de máxima actividad convulsiva.

Hemos desarrollado un modelo farmacocinético poblacional ¹⁴⁷ para caracterizar la evolución temporal del topiramato en el organismo de recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia. El modelo farmacocinético estructural consiste en un modelo monocompartimental con absorción, distribución lineal y eliminación de primer orden y con dos valores de aclaramiento diferentes, uno para el periodo de hipotermia (CL1) y otro para el periodo posterior al recalentamiento (CL2). El aclaramiento de creatinina no se consideró en el modelo ya que uno de los objetivos

era evaluar el efecto de los períodos de hipotermia y post-recalentamiento sobre el aclaramiento de topiramato. Como también se espera que el aclaramiento de creatinina cambie entre ambos estados de temperatura, su inclusión como covariable enmascararía el efecto de la temperatura corporal sobre el aclaramiento de topiramato. La administración conjunta de fenobarbital no fue una covariable significativa para el aclaramiento. Aunque ha sido descrita una posible interacción entre el fenobarbital y el topiramato, como consecuencia del potencial efecto del fenobarbital para inducir el metabolismo de topiramato ¹⁴⁸, el corto tiempo de coadministración de ambos fármacos en este estudio impide la detección de dicha interacción.

El análisis farmacocinético ¹⁴⁷ fue capaz de predecir la probabilidad de eventos convulsivos a lo largo del tiempo, aunque no se encontró una correlación significativa entre las concentraciones de topiramato y la probabilidad de convulsión. La ausencia de relación entre el topiramato y las convulsiones podría deberse al hecho de que las concentraciones séricas de topiramato fueron excesivamente bajas con el régimen de dosificación original de 5 mg/kg el primer día y 3 mg/kg en los días posteriores. Además, la incidencia de convulsiones en el grupo de topiramato en comparación con el grupo placebo podría estar relacionada exclusivamente con la administración de este medicamento sólo en las primeras 24 horas (Figura 22A), ya que la presencia de convulsiones hizo necesaria la administración secuencial de fenobarbital, midazolam y lidocaína en los pacientes de ambos

grupos. Por lo tanto, durante los días siguientes algunos pacientes de ambos grupos recibieron anticonvulsivantes, lo que podría explicar la presencia similar de convulsiones en ambos grupos.

El régimen modificado implica la administración de una dosis inicial de topiramato de 15 mg/kg que es 3 veces mayor que la dosis utilizada en el presente estudio, lo que podría generar problemas de seguridad. Sin embargo, se ha descrito que el topiramato administrado a dosis de 10 mg/kg es seguro en recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia ¹⁴⁴. Además, en un estudio realizado en niños de edades comprendidas entre 1 y 24 meses con crisis refractarias de inicio parcial ¹⁴⁹, el topiramato fue administrado inicialmente a 3 mg/kg/día y la dosis diaria, dividida en dos dosis, se incrementó hasta 3, 5, 15 y 25 mg/kg. Los autores de ese estudio informaron que el topiramato fue generalmente bien tolerado, aunque los efectos adversos emergentes del tratamiento fueron más frecuentes en los grupos de dosis más altas.

El programa de dosificación alternativo proporcionaría aproximadamente un 50% de los pacientes con concentraciones séricas máximas de topiramato superiores a 12 mg/L después de la primera dosis de 15 mg/kg y más del 90% de los pacientes con concentraciones séricas de topiramato por encima del límite inferior del rango terapéutico (5 mg/L) al final del primer día de tratamiento. Estos porcentajes se mantendrían en los días posteriores con una dosis de 5 mg/Kg, excepto en el día cinco como consecuencia del aumento del aclaramiento de topiramato después del recalentamiento de los pacientes. En contraste con

estos valores, el porcentaje de pacientes con concentraciones séricas de topiramato dentro del rango terapéutico es muy bajo con el régimen original, especialmente durante el primer día. En el caso del plan de dosificación alternativo, la proporción de pacientes con concentraciones séricas de topiramato superiores a 20 mg/L, que es el límite superior del rango terapéutico, es de alrededor del 6% durante el primer día y aumenta al 18% en el día cinco.

6.2 Objetivos secundarios

6.2.1 Aspectos relacionados con el estrés oxidativo

El estrés oxidativo refleja una situación de desequilibrio entre la formación de radicales libres y su neutralización. El sistema de defensa antioxidante incluye una serie de mecanismos (enzimáticos y no enzimáticos) que se encargan de la eliminación y/o reducción de las especies reactivas. Se ha descrito que durante la reoxigenación/reperfusión tras un episodio de hipoxia-isquemia se produce un gran aumento de sustancias oxidantes con el consiguiente consumo de los mecanismos antioxidantes, produciéndose daño tisular en situaciones de profundo desequilibrio.

Los radicales libres generados tras un evento hipóxico-isquémico pueden ser muy dañinos provocando alteraciones en una gran variedad de moléculas como las proteínas, lípidos, glúcidos, ADN y ARN. Como mencionamos anteriormente una forma de evaluar el estado redox es a través del GSH y el cociente GSH/GSSG. La

situación óptima en el organismo sería aquella en la que hay un aumento del GSH, reflejo de un estado antioxidante o reductor. Otro modo de evaluar el daño oxidativo sería a través de la medición de la actividad de las enzimas antioxidantes, de manera que, en el caso de que hubiera un mayor daño oxidativo habría un aumento proporcional de la actividad enzimática como respuesta protectora. Sin embargo, en la actualidad se han seguido buscando biomarcadores que se puedan detectar en los diferentes fluidos biológicos derivados del daño oxidativo a diferentes componentes celulares como proteínas, lípidos, ADN o ARN y que nos permitirían evaluar también el daño tras un evento hipóxico-isquémico en nuestro caso y valorar el efecto de las terapias neuroprotectoras. En los últimos años han sido validados por nuestro grupo de investigación una serie de marcadores de daño oxidativo en distintos biofluidos en el periodo neonatal ⁴¹⁻⁴⁷.

Los isoprostanos, neuroprostanos, isofuranos y neurofuranos son moléculas similares a las prostaglandinas que se producen como resultado de la interacción de los radicales libres con el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosahexanoico (DHA), respectivamente. Actualmente estos metabolitos constituyen marcadores fiables de estrés oxidativo en el recién nacido. Los neuroprostanos y neurofuranos son subproductos del DHA, componente estructural del cerebro y, por lo tanto, los neuroprostanos y neurofuranos son marcadores relevantes de daño cerebral ⁴⁸.

Dentro de los productos validados de peroxidación lipídica se encuentran los isoprostanos. Recientemente un trabajo de nuestro grupo de casos y controles refleja que el nivel de isoprostanos está aumentado en los casos de acidosis metabólica grave en sangre de cordón apoyando el considerar los isoprostanos como potencial biomarcador predictor de EHI medido en sangre de cordón de los recién nacidos, aunque se necesitan estudios de mayor potencia para poder confirmarlo ¹⁵⁰.

En cuanto al topiramato y su efecto sobre el daño oxidativo a lípidos, el topiramato no mostró una reducción significativa de los biomarcadores selectivos de peroxidación lipídica, entre ellos los isoprostanos, no pudiendo demostrar que la administración de topiramato conjuntamente con la hipotermia tenga efecto sobre el daño oxidativo a lípidos en recién nacidos con EHI.

El grupo topiramato mostró una menor mortalidad asociada a EHI (9,2%), aunque no significativa, que el grupo placebo (19,2%). En modelos animales de isquemia cerebral el topiramato redujo la gravedad del daño cerebral solo o combinado con hipotermia ¹⁴³. La muerte neuronal que se produce tras un episodio de isquemia se ha asociado con cambios del receptor AMPA, la entrada masiva de calcio intracelular y como consecuencia con un aumento en la generación de radicales libres y apoptosis ¹⁵¹. En condiciones anaeróbicas el piruvato se desvía a la formación de L-lactato, que refleja la duración y la intensidad de la hipoxia ¹⁵². La hipotermia reduce la tasa metabólica entre un 5-8% por cada grado de disminución de la temperatura ¹⁵³. Los pacientes de nuestro estudio

mostraron un aumento en plasma de L-lactato, piruvato, acetoacetato y β -hidroxibutirato antes del inicio de la hipotermia terapéutica, sin embargo, la concentración de metabolitos disminuyó después de unas horas de hipotermia, lo que indica la restauración parcial del metabolismo aeróbico tras la estabilización clínica como consecuencia de la activación de los mecanismos de ahorro energético por la hipotermia terapéutica ³⁵. Nuestro estudio aporta por primera vez los rangos y la evolución de los valores de lactato en recién nacidos con EHI durante el tratamiento con hipotermia lo que podría resultar útil para la interpretación de los valores durante su monitorización en las unidades de cuidados intensivos neonatales. El acetoacetato y β -hidroxibutirato mostraron también una disminución de sus niveles en el tiempo (no estadísticamente significativa en el caso del acetoacetato), posiblemente atribuible a su utilización como sustrato energético. En un análisis de metabolómica que se ha realizado recientemente en los pacientes de nuestro estudio (sangre de todos los recién nacidos con EHI moderada/grave) se encontró la alteración de varias vías metabólicas, entre ellas el metabolismo de aminoácidos y purinas, y la biosíntesis de las hormonas esteroideas en aquellos recién nacidos que mostraron una RM cerebral patológica. Se encontró que las purinas (es decir, xantina y xantosina) estaban alteradas en muestras de sangre de recién nacidos con una RM cerebral patológica extraídas antes del inicio del tratamiento con hipotermia y la ruta de biosíntesis de las hormonas esteroideas estaban alteradas de manera significativa durante todo el período de

estudio, tanto antes del inicio como durante el tratamiento con hipotermia, proporcionando evidencia de la utilidad de los metabolitos de ambas vías como biomarcadores candidatos para ser evaluados en futuros estudios de validación clínica, lo que podría permitir en un futuro una predicción temprana del daño cerebral antes del daño morfológico detectado por RM cerebral, incluso en aquellos casos en los que por inestabilidad del paciente no se pudiera completar con el estudio de imagen. El conocimiento en profundidad de la alteración de estas vías podría además apoyar estudios dirigidos al desarrollo de terapias coadyuvantes de la hipotermia terapéutica ¹⁵⁴.

En nuestro estudio no se ha podido demostrar que la administración de topiramato conjuntamente con la hipotermia tenga efecto sobre el daño cerebral evaluado por RM en recién nacidos con EHI moderada/grave. Referente a la RM se recogieron variables específicas de alteración morfológica, difusión, así como datos de espectroscopia que en este sentido están pendientes de interpretación.

7. Limitaciones

Encontramos las siguientes limitaciones en nuestro estudio. En primer lugar, el tamaño muestral no tiene la potencia suficiente como para evaluar correctamente diferencias en objetivos secundarios, entre ellos la mortalidad. Aun así, encontramos una tendencia hacia una menor mortalidad en el grupo topiramato (9,2% vs 19,2%, $p=0,123$). En cualquier caso, son necesarios más estudios con un mayor número de pacientes reclutados para poder extraer conclusiones a este nivel.

En segundo lugar, se podría argumentar que la dosis de topiramato empleada fue baja en comparación con la utilizada por Filippi y colaboradores¹²⁰. En ese momento decidimos elegir el rango inferior de la dosis para evitar la posible toxicidad o efectos secundarios potenciales desconocidos. Como consecuencia, en un número considerable de pacientes no se alcanzó el rango terapéutico en las primeras 48 h (Figura 21).

En tercer lugar aunque la hipotermia terapéutica es una práctica clínica habitual, los pacientes se tenían que trasladar a las UCIN de nivel III para recibir el tratamiento del estudio, por eso no se pudieron obtener muestras de sangre del cordón umbilical de todos los pacientes. Este es un problema intrínseco de estos estudios y la exclusión de los recién nacidos aumentaría drásticamente el tiempo necesario para el reclutamiento de un número representativo de sujetos.

8. Conclusiones

1. Los datos de este estudio muestran una tendencia hacia la disminución de la actividad convulsiva en el grupo topiramato aunque con estos datos no podemos obtener resultados estadísticamente significativos.
2. Los datos de este estudio no encuentran diferencias estadísticamente significativas en la duración y/o frecuencia de las convulsiones entre el grupo topiramato y el grupo placebo.
3. Existe una tendencia hacia la disminución de la mortalidad asociada a EHI en el grupo topiramato aunque con los datos de este estudio no podemos obtener resultados estadísticamente significativos.
4. El modelo farmacocinético de la población ha sido capaz de describir el curso temporal del topiramato en recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia considerando dos aclaramientos secuenciales de topiramato. El recalentamiento de los recién nacidos aumentó el aclaramiento de topiramato en un 20,8%.
5. Los eventos convulsivos en los recién nacidos que recibieron topiramato se han descrito con éxito utilizando un modelo exponencial repetido de tiempo hasta el evento, aunque la exposición a topiramato no ha podido relacionarse con el

resultado farmacodinámico, lo cual se puede atribuir, al menos en parte, a las bajas concentraciones séricas de topiramato.

6. El programa de dosificación de topiramato alternativo ha sido capaz de predecir las concentraciones séricas dentro del rango terapéutico en más del 90% de los neonatos después de la primera dosis.
7. Este estudio no muestra diferencias significativas en los metabolitos del ciclo de Krebs ni en los biomarcadores de estrés oxidativo analizados entre ambos grupos.
8. El estudio metabólico aporta un método analítico validado para la determinación de varios metabolitos del ciclo de Krebs y cuerpos cetónicos en muestras de plasma de pequeño volumen (50 μ L) de recién nacidos con EHI en tratamiento con hipotermia. Además, informa por primera vez de la evolución de los metabolitos en el tiempo durante el tratamiento con hipotermia terapéutica.

9. Bibliografía

1. Novak CM, Ozen M, Burd I. Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. *Clin Perinatol.* 2018;45(2):357-375. doi:10.1016/j.clp.2018.01.015
2. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2012;72(2):156-166. doi:10.1002/ana.23647
3. Qin X, Cheng J, Zhong Y, et al. Mechanism and treatment related to oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Mol Neurosci.* 2019;12. doi:10.3389/fnmol.2019.00088
4. Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D, et al. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *J Pediatr.* 2005;146(4):453-460. doi:10.1016/j.jpeds.2004.12.026
5. Martínez-Biarge M, Blanco D, García-Alix A, Salas S. Seguimiento de los recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica. *An Pediatr.* 2014;81(1):52.e1-14. doi:10.1016/j.anpedi.2013.06.015
6. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:78. doi:10.3389/fncel.2017.00078
7. Lee ACC, Kozuki N, Blencowe H, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res.* 2013;74 Suppl 1:50-72.

doi:10.1038/pr.2013.206

8. Arnaez J, García-Alix A, Arca G, et al. Incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy and use of therapeutic hypothermia in Spain. *An Pediatr.* 2018;89(1):12-23. doi:10.1016/j.anpedi.2017.06.008
9. Tagin MA, Woolcott CG, Vincer MJ, Whyte RK, Stinson DA. Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: An updated systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012;166(6):558-566. doi:10.1001/archpediatrics.2011.1772
10. Shah PS. Hypothermia: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(5):238-246. doi:10.1016/j.siny.2010.02.003
11. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: Synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ.* 2010;340(7743):409. doi:10.1136/bmj.c363
12. McKinstry RC, Miller JH, Snyder AZ, et al. A prospective, longitudinal diffusion tensor imaging study of brain injury in newborns. *Neurology.* 2002;59(6):824-833. doi:10.1212/WNL.59.6.824
13. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* 2000;20(21):7994-8004. doi:10.1523/jneurosci.20-21-07994.2000

14. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):22368-22401. doi:10.3390/ijms160922368
15. Nuñez A, Benavente I, Blanco D, et al. Oxidative stress in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *An Pediatr.* 2018;88(4):228.e1-228.e9. doi:10.1016/j.anpedi.2017.05.005
16. Johnston M V., Trescher WH, Ishida A, Nakajima W, Zipursky A. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res.* 2001;49(6):735-741. doi:10.1203/00006450-200106000-00003
17. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci.* 2014;8(8 FEB):40. doi:10.3389/fnins.2014.00040
18. Gunn AJ, Laptook AR, Robertson NJ, et al. Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. *Pediatr Res.* 2017;81(1-2):202-209. doi:10.1038/pr.2016.198
19. Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol.* 2000;5(1):3-16. doi:10.1053/siny.1999.0112
20. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol.* 2004;28(6):425-432. doi:10.1053/j.semperi.2004.10.005
21. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic

- encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr.* 2015;169(4):397-403. doi:10.1001/jamapediatrics.2014.3269
22. Gunn AJ, Bennet L. Timing still key to treating hypoxic ischaemic brain injury. *Lancet Neurol.* 2016;15(2):126-127. doi:10.1016/S1474-4422(15)00386-5
 23. Stamati K, Mudera V, Cheema U. Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2011;2(1):2041731411432365. doi:10.1177/2041731411432365
 24. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: Pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol.* 2013;47(1):9-23. doi:10.1007/s12035-012-8344-z
 25. Johnston M V., Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):372-382. doi:10.1016/S1474-4422(11)70016-3
 26. Muller AJ, Marks JD. Hypoxic-ischemic brain injury: Potential therapeutic interventions for the future. *Neoreviews.* 2014;15(5):e177-e186. doi:10.1542/neo.15-5-e177
 27. Johnston M V. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 2005;15(3):234-240. doi:10.1111/j.1750-

3639.2005.tb00526.x

28. Burd I, Welling J, Kannan G, Johnston M V. Excitotoxicity as a Common Mechanism for Fetal Neuronal Injury with Hypoxia and Intrauterine Inflammation. In: *Advances in Pharmacology*. Vol 76. ; 2016:85-101. doi:10.1016/bs.apha.2016.02.003
29. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1(1):244-257. doi:10.1016/j.redox.2013.01.014
30. Vento M., Hummler H., Dawson JA., Escobar J. KJ. No Title. In: Dennery PABG, Saugstad OD editores., ed. *Perinatal and Prenatal Disorders*. New York: Humana Press, New York, NY; 2014:213-243.
31. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. In: *Developmental Neuroscience*. Vol 23. ; 2001:198-202. doi:10.1159/000046143
32. Hagberg H, David Edwards A, Groenendaal F. Perinatal brain damage: The term infant. *Neurobiol Dis*. 2016;92(Part A):102-112. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.011
33. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
34. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*.

- 2015;6:524-551. doi:10.1016/j.redox.2015.08.020
35. Sánchez-Illana Á, Núñez-Ramiro A, Cernada M, et al. Evolution of energy related metabolites in plasma from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy during hypothermia treatment. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-17202-7
 36. Shah S, Tracy M, Smyth J. Postnatal lactate as an early predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. *J Perinatol.* 2004;24(1):16-20. doi:10.1038/sj.jp.7211023
 37. Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, et al. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(5):794-805. doi:10.1038/jcbfm.2014.253
 38. Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol.* 2006;17(5-6):431-439. doi:10.1097/00008877-200609000-00009
 39. Reinke SN, Walsh BH, Boylan GB, et al. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: Implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res.* 2013;12(9):4230-4239. doi:10.1021/pr400617m
 40. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431-

435. doi:10.1038/nature13909

41. Cháfer-Pericás C, Rahkonen L, Sánchez-Illana A, et al. Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. *Anal Chim Acta*. 2015;886:214-220. doi:10.1016/j.aca.2015.06.028
42. Cháfer-Pericás C, Torres-Cuevas I, Sanchez-Illana A, et al. Development of a reliable analytical method to determine lipid peroxidation biomarkers in newborn plasma samples. *Talanta*.2016;153:152-157. doi:10.1016/j.talanta.2016.03.010
43. Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Cárcel M, et al. Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal ChimActa*.2016;913:104-110. doi:10.1016/j.aca.2016.01.054
44. Escobar J, Sánchez-Illana Á, Kuligowski J, et al. 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. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;123:104-112. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.007
45. Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Quintás G, et al. Assessment of oxidative damage to proteins and DNA in urine of newborn infants by a validated UPLC-MS/MS approach. *PLoS One*. 2014;9(4):e93703.

doi:10.1371/journal.pone.0093703

46. Kuligowski J, Escobar J, Quintás G, et al. Analysis of lipid peroxidation biomarkers in extremely low gestational age neonate urines by UPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(18):4345-4356. doi:10.1007/s00216-014-7824-6
47. Kuligowski J, Aguar M, Rook D, et al. Urinary Lipid Peroxidation Byproducts: Are They Relevant for Predicting Neonatal Morbidity in Preterm Infants? *Antioxidants Redox Signal.* 2015;23(2):178-184. doi:10.1089/ars.2015.6262
48. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* 2017;12:674-681. doi:10.1016/j.redox.2017.03.011
49. Solberg R, Andresen JH, Escrig R, Vento M, Saugstad OD. Resuscitation of hypoxic newborn piglets with oxygen induces a dose-dependent increase in markers of oxidation. *Pediatr Res.* 2007;62(5):559-563. doi:10.1203/PDR.0b013e318156e8aa
50. Solberg R, Longini M, Proietti F, Vezzosi P, Saugstad OD, Buonocore G. Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(5):1061-1067. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.022
51. Rook D, Schierbeek H, Vento M, et al. Resuscitation of preterm infants with different inspired oxygen fractions. *J Pediatr.* 2014;164(6). doi:10.1016/j.jpeds.2014.02.019
52. Solberg R, Kuligowski J, Pankratov L, et al. Changes of the

- plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res.* 2016;80(2):284-292. doi:10.1038/pr.2016.66
53. Ahearne CE, Denihan NM, Walsh BH, et al. Early cord metabolite index and outcome in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Neonatology.* 2016;110(4):296-302. doi:10.1159/000446556
54. Denihan NM, Boylan GB, Murray DM. Metabolomic profiling in perinatal asphyxia: A promising new field. *Biomed Res Int.* 2015;2015:254076. doi:10.1155/2015/254076
55. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3527579. doi:10.1155/2016/3527579
56. Kelley EE. A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacol Reports.* 2015;67(4):669-674. doi:10.1016/j.pharep.2015.05.004
57. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic Neuroprotective Strategies in Neonatal Brain Injury. *Clin Perinatol.* 2014;41(1):119-131. doi:10.1016/j.clp.2013.09.004
58. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. *Lancet.* 2005;365(9460):663-670. doi:10.1016/S0140-6736(05)17946-X

59. Azzopardi D, Brocklehurst P, Edwards D, et al. The TOBY study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: A randomised controlled trial. *BMC Pediatr.* 2008;8(1):17. doi:10.1186/1471-2431-8-17
60. Azzopardi D V., Strohm B, Edwards AD, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med.* 2009;361(14):1349-1358. doi:10.1056/NEJMoa0900854
61. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2005;353(15):1574-1584. doi:10.1056/NEJMcps050929
62. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2013(1). doi:10.1002/14651858.CD003311.pub3
63. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, et al. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2085-2092. doi:10.1056/NEJMoa1112066
64. Guillet R, Edwards AD, Thoresen M, et al. Seven-to eight-year follow-up of the CoolCap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatr Res.* 2012;71(2):205-209. doi:10.1038/pr.2011.30
65. Lehtonen L, Gimeno A, Parra-Llorca A, Vento M. Early

- neonatal death: A challenge worldwide. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(3):153-160. doi:10.1016/j.siny.2017.02.006
66. Papile LA, Baley JE, Benitz W, et al. Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics.* 2014;133(6):1146-1150. doi:10.1542/peds.2014-0899
67. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: Emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol.* 2014;51(4):481-488. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.06.008
68. Juul SE, Pet GC. Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. *Clin Perinatol.* 2015;42(3):469-481. doi:10.1016/j.clp.2015.04.004
69. Mazur M, Miller RH, Robinson S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury: Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr.* 2010;6(3):206-221. doi:10.3171/2010.5.PEDS1032
70. Traudt CM, Juul SE. Erythropoietin as a neuroprotectant for neonatal brain injury: animal models. *Methods Mol Biol.* 2013;982:113-126. doi:10.1007/978-1-62703-308-4_7
71. van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev.* 2008;59(1):22-33. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.04.007

72. Fan X, van Bel F, van der Kooij MA, Heijnen CJ, Groenendaal F. Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatr Res.* 2013;73(1):18-23. doi:10.1038/pr.2012.139
73. Fang AY, Gonzalez FF, Sheldon RA, Ferriero DM. Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2013;73(1):12-17. doi:10.1038/pr.2012.138
74. Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, et al. Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci.* 2013;35(6):491-503. doi:10.1159/000355460
75. Wu YW, Mathur AM, Chang T, et al. High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-Ischemic encephalopathy: A phase II trial. *Pediatrics.* 2016;137(6). doi:10.1542/peds.2016-0191
76. Juul SE, Comstock BA, Heagerty PJ, et al. High-Dose Erythropoietin for Asphyxia and Encephalopathy (HEAL): A Randomized Controlled Trial-Background, Aims, and Study Protocol. *Neonatology.* 2018;113(4):331-338. doi:10.1159/000486820
77. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3527579. doi:10.1155/2016/3527579
78. Kelley EE. A new paradigm for XOR-catalyzed reactive

- species generation in the endothelium. *Pharmacol Reports*. 2015;67(4):669-674. doi:10.1016/j.pharep.2015.05.004
79. Van Bel F, Shadid M, Moison RMW, et al. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics*. 1998;101(2):185-193. doi:10.1542/peds.101.2.185
80. Benders MJNL, Bos AF, Rademaker CMA, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(3):F163-5. doi:10.1136/adc.2005.086652
81. Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, et al. Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012;97(3):F162-6. doi:10.1136/archdischild-2011-300356
82. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics*. 2009;124(1):350-357. doi:10.1542/peds.2008-2228
83. Kaandorp JJ, Benders MJNL, Schuit E, et al. Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: a novel neuroprotective intervention? A multicentre randomised placebo controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(3):F216-23. doi:10.1136/archdischild-2014-306769
84. Hendaus MA, Jomha FA, Alhammadi AH. Melatonin in the

- management of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Light at the end of the tunnel? *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:2473-2479. doi:10.2147/NDT.S115533
85. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: Reduction by melatonin. *J Pineal Res.* 2001;31(4):343-349. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.310409.x
86. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res.* 2008;44(2):157-164. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00503.x
87. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain.* 2013;136(1):90-105. doi:10.1093/brain/aws285
88. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: A randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* 2015;35(3):186-191. doi:10.1038/jp.2014.186
89. Hobbs C, Thoresen M, Tucker A, Aquilina K, Chakkarapani E, Dingley J. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke.* 2008;39(4):1307-1313.

doi:10.1161/STROKEAHA.107.499822

90. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol*. 2010;68(3):330-341. doi:10.1002/ana.22016
91. Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): A proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(2):145-153. doi:10.1016/S1474-4422(15)00347-6
92. Schwartz-Bloom RD, Sah R. γ -aminobutyric acid A neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2001;77(2):353-371. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00274.x
93. Zhuang L, Yang T, Zhao H, et al. The protective profile of argon, helium, and xenon in a model of neonatal asphyxia in rats. *Crit Care Med*. 2012;40(6):1724-1730. doi:10.1097/CCM.0b013e3182452164
94. Fahlenkamp A V., Rossaint R, Haase H, et al. The noble gas argon modifies extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling in neurons and glial cells. *Eur J Pharmacol*. 2012;674(2-3):104-111. doi:10.1016/j.ejphar.2011.10.045
95. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, et al. Argon: Neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13(6). doi:10.1186/cc8214
96. Jawad N, Rizvi M, Gu J, et al. Neuroprotection (and lack of

- neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. *Neurosci Lett.* 2009;460(3):232-236. doi:10.1016/j.neulet.2009.05.069
97. Broad KD, Fierens I, Fleiss B, et al. Inhaled 45-50% argon augments hypothermic brain protection in a piglet model of perinatal asphyxia. *Neurobiol Dis.* 2016;87:29-38. doi:10.1016/j.nbd.2015.12.001
98. Mechoulam R, Hanuš L. Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. In: *Chemistry and Physics of Lipids.* Vol 121. ; 2002:35-43. doi:10.1016/S0009-3084(02)00144-5
99. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horváth B, et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(10):1368-1381. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.021
100. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, et al. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 2008;64(6):653-658. doi:10.1203/PDR.0b013e318186e5dd
101. Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res.* 2011;70(3):272-277. doi:10.1203/PDR.0b013e3182276b11

102. Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, et al. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology*. 2012;63(5):776-783. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.05.034
103. Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 2013;71:282-291. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.027
104. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, et al. Effects of cannabidiol and hypothermia on short-term brain damage in new-born piglets after acute hypoxia-ischemia. *Front Neurosci*. 2016;10(JUL):323. doi:10.3389/fnins.2016.00323
105. Diamandis T, Borlongan C V. One, two, three steps toward cell therapy for stroke. *Stroke*. 2015;46(2):588-591. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007105
106. Fleiss B, Guillot P V., Titomanlio L, Baud O, Hagberg H, Gressens P. Stem Cell Therapy for Neonatal Brain Injury. *Clin Perinatol*. 2014;41(1):133-148. doi:10.1016/j.clp.2013.09.002
107. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2014;164(5):973-979.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2013.11.036
108. Ängelagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E.

- Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. *Neurochem Res.* 2003;28(2):333-340. doi:10.1023/A:1022393604014
109. Ängehagen M, Ben-Menachem E, Shank R, Rönnbäck L, Hansson E. Topiramate modulation of kainate-induced calcium currents is inversely related to channel phosphorylation level. *J Neurochem.* 2003;88(2):320-325. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02186.x
 110. Ängehagen M, Rönnbäck L, Hansson E, Ben-Menachem E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca²⁺ transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem.* 2005;94(4):1124-1130. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03259.x
 111. Costa C, Martella G, Picconi B, et al. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke.* 2006;37(5):1319-1326. doi:10.1161/01.STR.0000217303.22856.38
 112. Zona C, Ciotti MT, Avoli M. Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett.* 1997;231(3):123-126. doi:10.1016/S0304-3940(97)00543-0
 113. Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia.* 2004;45(12):1478-1487. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.13504.x

114. Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An Overview of the Preclinical Aspects of Topiramate: Pharmacology, Pharmacokinetics, and Mechanism of Action. *Epilepsia*. 2000;41(s1):3-9. doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb02163.x
115. Follett PL, Deng W, Dai W, et al. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. *J Neurosci*. 2004;24(18):4412-4420. doi:10.1523/JNEUROSCI.0477-04.2004
116. Yang Y, Tandon P, Liu Z, Sarkisian MR, Stafstrom CE, Holmes GL. Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998;107(2):169-177. doi:10.1016/s0165-3806(97)00211-3
117. Liu Y, Barks JD, Xu G, Silverstein FS. Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke*. 2004;35(6):1460-1465. doi:10.1161/01.STR.0000128029.50221.fa
118. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, et al. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res*. 2005;1058(1-2):129-136. doi:10.1016/j.brainres.2005.07.061
119. Filippi L, La Marca G, Fiorini P, et al. Topiramate concentrations in neonates treated with prolonged whole

- body hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy. *Epilepsia*. 2009;50(11):2355-2361. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02302.x
120. Filippi L, Poggi C, La Marca G, et al. Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: A safety study. *J Pediatr*. 2010;157(3):361-366. doi:10.1016/j.jpeds.2010.04.019
 121. Ronen GM, Buckley D, Penney S, Streiner DL. Long-term prognosis in children with neonatal seizures: a population-based study. *Neurology*. 2007;69(19):1816-1822. doi:10.1212/01.wnl.0000279335.85797.2c
 122. Tekgul H, Gauvreau K, Soul J, et al. The current etiologic profile and neurodevelopmental outcome of seizures in term newborn infants. *Pediatrics*. 2006;117(4):1270-1280. doi:10.1542/peds.2005-1178
 123. Silverstein FS, Jensen FE. Neonatal seizures. *Ann Neurol*. 2007;62(2):112-120. doi:10.1002/ana.21167
 124. Moreira JD, de Siqueira L V, Lague VM, Porciúncula LO, Vinadé L, Souza DO. Short-term alterations in hippocampal glutamate transport system caused by one-single neonatal seizure episode: implications on behavioral performance in adulthood. *Neurochem Int*. 2011;59(2):217-223. doi:10.1016/j.neuint.2011.05.008
 125. Rakhade SN, Klein PM, Huynh T, et al. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia*. 2011;52(4):753-765.

doi:10.1111/j.1528-1167.2011.02992.x

126. Miller SP, Weiss J, Barnwell A, et al. Seizure-associated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. *Neurology*. 2002;58(4):542-548. doi:10.1212/WNL.58.4.542
127. Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2014;99(3):F219-24. doi:10.1136/archdischild-2013-305206
128. Wyatt JS, Gluckman PD, Liu PY, et al. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatrics*. 2007;119(5):912-921. doi:10.1542/peds.2006-2839
129. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15089-15094. doi:10.1073/pnas.222550499
130. Kim J, Kondratyev A, Gale K. Antiepileptic drug-induced neuronal cell death in the immature brain: effects of carbamazepine, topiramate, and levetiracetam as monotherapy versus polytherapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(1):165-173. doi:10.1124/jpet.107.126250
131. Kim J-S, Kondratyev A, Tomita Y, Gale K. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5(SUPPL. 5):19-26. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01285.x

132. Forcelli PA, Kim J, Kondratyev A, Gale K. Pattern of antiepileptic drug-induced cell death in limbic regions of the neonatal rat brain. *Epilepsia*. 2011;52(12):e207. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03297.x
133. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal Encephalopathy Following Fetal Distress: A Clinical and Electroencephalographic Study. *Arch Neurol*. 1976;33(10):696-705. doi:10.1001/archneur.1976.00500100030012
134. Glass HC, Sullivan JE. Neonatal seizures. *Curr Treat Options Neurol*. 2009;11(6):405-413. doi:10.1007/s11940-009-0045-1
135. Glass HC, Nash KB, Bonifacio SL, et al. Seizures and magnetic resonance imaging-detected brain injury in newborns cooled for hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2011;159(5):731-735.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2011.07.015
136. Nash KB, Bonifacio SL, Glass HC, et al. Video-EEG monitoring in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *Neurology*. 2011;76(6):556-562. doi:10.1212/WNL.0b013e31820af91a
137. Kharoshankaya L, Stevenson NJ, Livingstone V, et al. Seizure burden and neurodevelopmental outcome in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. 2016;58(12):1242-1248. doi:10.1111/dmcn.13215
138. Saugstad OD, Ramji S, Soll RF, Vento M. Resuscitation of

- newborn infants with 21% or 100% oxygen: An updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology*. 2008;94(3):176-182. doi:10.1159/000143397
139. Kapadia VS, Chalak LF, DuPont TL, Rollins NK, Brion LP, Wyckoff MH. Perinatal asphyxia with hyperoxemia within the first hour of life is associated with moderate to severe hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2013;163(4):949-954. doi:10.1016/j.jpeds.2013.04.043
140. Dawson JA, Kamlin COF, Vento M, et al. Defining the reference range for oxygen saturation for infants after birth. *Pediatrics*. 2010;125(6):e1340-7. doi:10.1542/peds.2009-1510
141. Hellstro m-Westas L, Rosen I, de Vries LS, Greisen G. Amplitude-integrated EEG Classification and Interpretation in Preterm and Term Infants. *Neoreviews*. 2006;7(2):e76-e87. doi:10.1542/neo.7-2-e76
142. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al. Antiepileptic drugs - Best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2008;49(7):1239-1276. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01561.x
143. Glass HC, Poulin C, Shevell MI. Topiramate for the treatment of neonatal seizures. *Pediatr Neurol*. 2011;44(6):439-442. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.01.006

144. Filippi L, Fiorini P, Catarzi S, et al. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study. *J Matern Neonatal Med.* 2018;31(8):973-980. doi:10.1080/14767058.2017.1304536
145. Rakhade SN, Zhou C, Aujla PK, Fishman R, Sucher NJ, Jensen FE. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J Neurosci.* 2008;28(32):7979-7990. doi:10.1523/JNEUROSCI.1734-08.2008
146. El-Dib M, Soul JS. The use of phenobarbital and other anti-seizure drugs in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(5):321-327. doi:10.1016/j.siny.2017.07.008
147. Marques MR, Garcia-Robles A, Usach I, et al. Topiramate pharmacokinetics in neonates undergoing therapeutic hypothermia and proposal of an optimised dosing schedule. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2020;109(2):300-308. doi:10.1111/apa.14944
148. Bialer M, Doose DR, Murthy B, et al. Pharmacokinetic interactions of topiramate. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(12):763-780. doi:10.2165/00003088-200443120-00001
149. Manitpisitkul P, Shalayda K, Todd M, Wang SS, Ness S, Ford L. Pharmacokinetics and safety of adjunctive topiramate in infants (1-24 months) with refractory partial-onset seizures: A randomized, multicenter, open-label phase

- 1 study. *Epilepsia*. 2013;54(1):156-164. doi:10.1111/epi.12019
150. Chafer-Pericas C, Cernada M, Rahkonen L, Stefanovic V, Andersson S, Vento M. Preliminary case control study to establish the correlation between novel peroxidation biomarkers in cord serum and the severity of hypoxic ischemic encephalopathy. *Free Radic Biol Med*. 2016;97:244-249. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.006
151. Colbourne F, Grooms SY, Zukin RS, Buchan AM, Bennett MVL. Hypothermia rescues hippocampal CA1 neurons and attenuates down-regulation of the AMPA receptor GluR2 subunit after forebrain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2906-2910. doi:10.1073/pnas.2628027100
152. Saugstad OD. Is lactate a reliable indicator of tissue hypoxia in the neonatal period? *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2002;91(1):17-19. doi:10.1080/080352502753457888
153. Takenouchi T, Sugiura Y, Morikawa T, et al. Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(5):794-805. doi:10.1038/jcbfm.2014.253
154. Piñeiro-Ramos JD, Núñez-Ramiro A, Llorens-Salvador R, et al. Metabolic phenotypes of hypoxic-ischemic encephalopathy with normal vs. Pathologic magnetic resonance imaging outcomes. *Metabolites*. 2020;10(3). doi:10.3390/metabo10030109

