

## **UTILIDAD DEL MICROTEST DE DENSIDAD ERITROCITARIA COMO INDICADOR DE HIPOXIA EN RATAS**

\*Dra. Celia María Upmann. Ponce de León. Calle 6 núm. 324 entre 13 y 15. El Vedado. Plaza de la Revolución. Ciudad de La Habana. Teléfono: 831-2049

\*\*Dra. María Amelia Presmanes Cabo. Pepe Antonio núm. 461. Guanabacoa. Ciudad de La Habana. Teléfono: 97-6539

\*\*\* Dra. Lourdes López Yáñez. Calle 6 núm.115 e/ Calzada y 5ta. Vedado Ciudad de La Habana. Teléfono. 8311749  
lululo2000@yahoo.com

\*Dra. en Ciencias Biológicas y Profesora consultante del Instituto Ciencias Básicas y Preclínicas (ICBP) "Victoria de Girón".

\*\*Especialista Primer Grado en Bioquímica Clínica y Profesora asistente de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM)Julio Trigo.

\*\*\*Especialista Primer Grado en Bioquímica Clínica.

### **SUMMARY**

Many scientists try to detect as soon as possible perinatal hypoxia due to its adverse consequences in the morpho-functional development of the newborn child.<sup>4,5,6</sup> This is particularly important considering the risks it represents for this age group. Our team has designed 3 models of experimental hypoxia in very young rats: moderate chronic hypobaric hypoxia, severe chronic hypobaric hypoxia and acute hypoxia by gas substitution. After the hypoxic episodes, the nine day old rats were sacrificed and their blood was used to perform the erythrocyte density microtest.<sup>10</sup> This test indicates the percentage of young erythrocytes present in blood. In our 3 models of hypoxia the results show that the values obtained in the hypoxic groups were significantly higher than those obtained in their control groups. These results demonstrate the value of this test to detect past episodes of hypoxia in young rats.

### **RESUMEN**

Es importante detectar a tiempo los episodios hipóxicos en el período perinatal, debido a sus adversas consecuencias en el desarrollo morfofuncional del niño y, por eso, diversos científicos han realizado investigaciones sobre este tema.<sup>4, 5, 8</sup> También con este propósito y para estudiar las alteraciones creadas por la hipoxia nuestro grupo creó tres modelos de hipoxia experimental en ratas muy jóvenes: Hipoxia hipobárica crónica (moderada una, severa la otra) e hipoxia aguda por sustitución de gases. Posteriormente a la aplicación de la hipoxia, las ratas, en su noveno día de nacidas fueron sacrificadas para realizarles en una muestra de sangre el microtest de densidad eritrocitaria ( $\mu$ TDE).<sup>10</sup> Este nos indica el porciento de células jóvenes de la serie roja en sangre. Hubo aumentos significativos en los grupos experimentales de los tres modelos de hipoxia en

relación con sus grupos controles, y esto nos demuestra su utilidad como indicador de hipoxia.

**Palabras claves:** Hipoxia hipobárica; Hipoxia por sustitución de gases; Microtest de densidad eritrocitaria; Hipoxia aguda; Hipoxia crónica.

## INTRODUCCION

Es bien conocida la incidencia que tienen los episodios hipóxicos durante el período perinatal, y las consecuencias que a corto y a largo plazos ocasionan sobre la vida del feto y su ulterior desarrollo<sup>1, 2, 3</sup>.

Es por eso que en muchos países se realizan investigaciones que relacionan la hipoxia con cambios metabólicos cerebrales,<sup>4,5,6,7</sup> con cambios morfofisiológicos del sistema nervioso central (SNC)<sup>8,9</sup> y se buscan múltiples métodos para tratar de detectar hipoxia en el feto o en el niño en el período perinatal, debido a diferentes procesos que ocurren durante el embarazo.<sup>10,11,12</sup> Nuestro grupo de trabajo investiga en este campo y ha creado para este propósito tres modelos de hipoxia experimental en ratas. En estos modelos pusimos a prueba el microtest de densidad eritrocitaria ( $\mu$ TDE)<sup>13</sup> como indicador de hipoxia. En estos modelos se simulan condiciones de hipoxia-asfixia semejantes a lo que les acontece a los niños en el período perinatal, hipoxias moderadas, hipoxias más severas e hipoxias con asfixia que incluso necesitan tratamientos de resucitación.<sup>14,15</sup>

## MATERIALES Y METODOS

### *Descripción del sistema empleado para producir hipoxia hipobárica*

Las ratas se colocaron en una cámara (5 a 6 litros de capacidad), que estaba conectada a una bomba de vacío. Mediante una válvula se permitió la entrada de un flujo de aire aproximadamente de 15 L/h. La cámara también estaba conectada a un barómetro y un termómetro.

### *Material biológico*

Se utilizaron ratas albinas *Sprague Dowley* del Bioterio del ICBP "Victoria de Girón", alimentadas con ración. Ratas madres y crías se mantuvieron a una temperatura y a un ciclo de luz y oscuridad natural. Fuera de la cámara tuvieron libre acceso al agua y a la comida; y dentro sólo tuvieron libre acceso a la comida.

Se conformaron seis grupos de ratas: tres grupos experimentales que se corresponde cada uno con los tres modelos de hipoxia utilizados y tres grupos controles (uno para cada modelo experimental).

Antes de somerlas a la hipoxia, se mezclaron las ratas de las madres recién paridas y luego se distribuyeron entre las tres madres para obtener una mejor homogeneidad entre los grupos.

### *Descripción de los distintos modelos de hipoxia*

#### I. Hipoxia hipobárica moderada crónica

Una vez dentro de la cámara, la rata madre con sus ratas fueron sometidas a cinco días de hipoxia con una presión parcial de O<sub>2</sub> de 10,6 kilopascales (Kp) durante 8 horas cada día. La hipoxia se comenzó a aplicar al cuarto día posterior al nacimiento desde las 8:30

a.m. a las 4:30 p.m. Al noveno día, las ratas fueron decapitadas para analizar las muestras de sangre y realizar el  $\mu$ TDE.

## II. Hipoxia hipobárica severa crónica

También durante cinco días (cuatro, al octavo día posterior al nacimiento), las ratas con sus madres se sometieron a una hipoxia. Sin embargo, durante el cuarto día, se les sometió a una presión parcial de O<sub>2</sub> de 10,6 Kp durante 8 horas; el quinto y séptimo días la presión fue de 7,7 Kp durante 4 horas y el sexto y octavo días la presión fue de 10,6 Kp durante veinticuatro horas. Cuando se aplicó la hipoxia de 7,7 Kp, la rata madre se excluyó de la cámara. Al noveno día se procedió igual que con el grupo anterior.

## III. Hipoxia aguda por sustitución de gases

En este modelo, las ratas sin sus madres, al octavo día posterior a su nacimiento, fueron introducidas en la cámara de hipoxia en la que se sustituyó el aire atmosférico por nitrógeno con un flujo de 2,5 L/min, durante 5 min. Mostraron signos hipóxicos como cianosis hipernea seguidos de la suspensión aparente de todo movimiento vital. Para su reanimación los animales necesitaron estímulos manuales. Luego de la reanimación, las ratas volvieron a colocarse dentro de las jaulas junto a sus madres. Esta hipoxia se aplicó en el horario de 4 a 5 p.m. Las ratas se sacrificaron a las 16 horas posteriores a este tratamiento.

### *Grupos controles (Hipoxias simuladas)*

Las ratas de los grupos controles (un grupo por cada modelo) se manipularon igual que las ratas sometidas a la hipoxia, sólo que no se les aplicó ningún tipo de hipoxia; la presión dentro de la cámara fue la atmosférica.

En el trabajo con las ratas se tuvo en cuenta las normas éticas referentes a animales de laboratorio en correspondencia con la Declaración Universal de los Derechos de los Animales y fueron aprobados por la Comisión de Ética de nuestra Institución.

### *$\mu$ TDE*

A todas las ratas se les realizó el  $\mu$ TDE, prueba cuyo fundamento y técnica operatoria ya fueron descritas en un trabajo anterior.<sup>13</sup>

### *Tratamiento estadístico*

Se obtuvo la media y la desviación estándar de los resultados del  $\mu$ TDE, de las ratas de cada grupo. A pesar de que la sangre de rata se hemoliza con gran facilidad,<sup>17</sup> nosotros obtuvimos pocas muestras de sangre hemolizadas, las cuales desechamos. Aplicamos el test estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis<sup>18</sup> para las comparaciones entre los grupos.

## **RESULTADOS**

Como podemos observar en las tablas I, II y III, los valores del  $\mu$ TDE de los grupos experimentales siempre resultaron aumentados con diferencias significativas en relación con sus grupos controles en todos los modelos de hipoxia.

## **DISCUSION**

Está demostrado que la hipoxia provoca secreción de eritropoyetina por el riñón con la consiguiente estimulación de la síntesis de células de la serie roja de la sangre y su liberación a ésta.<sup>12</sup> Un método que se ha empleado para detectar la hipoxia es el conteo de reticulocitos.<sup>19</sup> Sin embargo el TDE es más sensible que el conteo de reticulocitos, pues mide no sólo éstos, sino las células rojas jóvenes que incluye a los anteriores.<sup>20</sup> Sin embargo, estos resultados se manifestaron en forma diferente en los distintos modelos. En el grupo de ratas sometidas a hipoxia aguda, el valor de  $\mu$ TDE aumentó sólo

ligeramente en relación con su control ( $p \leq 0,015$ ). También sucede así si comparamos los valores de la hipoxia aguda con los de las hipoxias crónicas. Esto puede explicarse por el poco tiempo transcurrido entre la hipoxia de 5 min. y el momento en que se sacrificaron las ratas, 16 horas después. No es así en el caso de las hipoxias crónicas, en el que el tiempo de exposición a la hipoxia fue mayor, lo que da lugar a que la respuesta correspondiente al aumento del número de células jóvenes de la serie roja <sup>12</sup> pueda manifestarse plenamente. En la hipoxia aguda, el aumento del  $\mu$ TDE del grupo experimental con respecto a su control fue de 107%, en la hipoxia crónica moderada fue de 499% y en la crónica severa de 503%.

Los resultados obtenidos por nosotros en ratas concuerdan en parte con los resultados de algunos de los grupos que Cápiro y col.<sup>2</sup> obtuvieron en niños, valores elevados del TDE; pero ellos clasificaron a los niños de acuerdo con el peso al nacer (mayores o menores de 2 500g) y de acuerdo con el conteo del Apgar (mayor o menor de 7).

En publicaciones posteriores se describirán los resultados obtenidos en los cerebros de estos grupos de ratas.

## CONCLUSIONES

Se describieron los tres modelos experimentales de hipoxia, creados por nuestro grupo de trabajo en ratas recién nacidas y que produjeron diferentes grados de hipoxia. En cada modelo se comprueba el grado de hipoxia logrado al observar los valores del  $\mu$ TDE. Estos resultados demuestran la utilidad de esta técnica como indicador de la severidad de la hipoxia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Valdés-Dapena, M. A. El feto y el niño recién nacido. En: Nelson W E. Tratado de Pediatría. Barcelona, Spain: Salvat Editores, S. A.; 1976, p.371.
- 2.- Cápiro, P., Fernández-Regalado, R., Presmanes, M. A., Muñoz, S., Gross, J., Rodríguez, C. El test de densidad eritrocitaria y la creatina eritrocitaria: Dos posibles técnicas para evaluar asfixia perinatal. Rev. Cubana de Pediatría. 1988; 60(1): 29-35.
- 3.- Westgate, J, A., Gunn, A. J., Gunn, T. R. Antecedents of neonatal encephalopathy with fetal acidemia at term. Br J Obstet Gynecol .1999 Aug; 106(8): 774-82.
- 4.- van Capellen, A. M., Heerschap, A., Nijhuis, J. G., Oeseburg, B., Jonsma, H. W. Hypoxia, the subsequent systemic metabolic acidosis, and their relationship with cerebral metabolite concentrations: An in vivo study in fetal lambs with proton magnetic resonance spectroscopy. Am J. Obstet Gynecol. 1999 Dec;181(6): 1537-45.
- 5.- Gross, J., Ungethum, U., Anckeeva, N., Heldt, J., Cao, J., Marschhausen, C., *et al.* Hypoxia during early developmental period induce long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. Neurocience. 1999; 92(2): 699-704.
- 6.- Lubec, B., Koslov, A. V., Krapfenbaver, K., Berguer, A., Hoeger, H., Herrera-Marschitz, M., *et al.* Nitric oxide and nitric oxide synthase in the early phase of perinatal asphyxia of the rat. Neurocience. 1999; 93(3): 1017-23.

- 7.- Lun, A., *et al.* The vulnerable period of perinatal hypoxia with regard to dopamine release and behaviour in adult rats. *Biomed. Biochem. Acta* 1986;(5): 619-627.
- 8.- Bronw, J. K., *et al.* Neurological aspects of perinatal asfixia. *Develop: Miel Child Neurol.* 1974; (16): 567-580.
- 9.- Banerjea, M.C., Speer, C.P. Bilateral thalamic lesions in a newborn with intrauterine asphyxia after maternal cardiac arrest--a case report with literature review. *J Perinatol.* 2001 Sep;21(6):405-9.
- 10.- Castro-Gago, M. y col. Biochemical parameters predictive of neuronal damage in childhood. *Rev Neurol.* 2001 Jun 16-30;32(12):1141-50.
- 11.- Xu L., Liu P., Yan D. Study on the relationship between perinatal hypoxia and concentration of endothelin-1 in amniotic fluid. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1999 Oct; 34(10):591-312.
- 12.- Siciarz, A. y col.: Urinary thiobarbituric acid-reacting substances as potential biomarkers of intrauterine hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2001 Jun;155(6):718-22.
- 13.- Presmanes, M. A., Upmann, C. M., López, L. Adaptación del microtest de densidad eritrocitaria y su estudio evolutivo en ratas jóvenes. *Rev. Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2001;20 (4): 275-278.
- 14.- Deorari, A.K. y col: Impact of education and training on neonatal resuscitation practices in 14 teaching hospitals in India. *Ann Trop Paediatr.* 2001 Mar;21(1):29-33.
- 15.- Arpino C. y col. Prenatal and perinatal determinants of neonatal seizures occurring in the first week of life. *J Child Neurol.* 2001 Sep;16(9):651-6.
- 16.- Thorngren-Jerneck, K. y col. Reduced postnatal cerebral glucose metabolism measured by PET after asphyxia in near term fetal lambs. *J Neurosci Res.* 2001 Dec. 1;66(5):844-50.
- 17.- Griffith, J. Q. y Farris, E. J. *The Rat in Laboratory Investigation*, J. B. Lippincott, Co.; USA: Copyright 1942; p. 354.
- 18.- Sydney, S. *Diseño experimental no paramétrico.* La Habana: Ed. Revolucionaria: 1970, p. 215.
- 19.- Saracoglu, F. y col. Nucleated red blood cells as a marker in acute and chronic fetal asphyxia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000 Nov;71(2):113-8.
- 20.- Lun, A. y col. Dichtebestimmung roter Blutzellen als möglicher Siebtest zur Erfassung einer pränatalen Hypoxie, *Z. Klin. Med.* 1985; 40(6): 429.

## **TABLAS DE RESULTADOS**

**TABLA 1: Hipoxia hipobárica moderada crónica**

Ratas (9 días de nacidas)	$\mu$ TDE (%) $X \pm DS$
Experimentales n = 12	52.0 $\pm$ 14.0*
Controles n = 10	10,4 $\pm$ 2,7

\*Es significativamente diferente al compararlo con el control, para una  $p \leq 3,4 \times 10^{-5}$

**TABLA 2: Hipoxia hipobárica severa crónica**

Ratas (9 días de nacidas)	$\mu$ TDE (%) $X \pm DS$
Experimentales n = 8	55,9 $\pm$ 9,2 *
Controles n = 7	11,1 $\pm$ 2,9

\* Es significativamente diferente al compararlo con el control, para una  $p \leq 5 \times 10^{-4}$

**TABLA : 3 Hipoxia aguda por sustitución de gases**

Ratas (9 días de nacidas)	$\mu$ TDE (%) $X \pm DS$
Experimentales n = 11	9,1 $\pm$ 1,6*
Controles n = 12	8,5 $\pm$ 3,8

\* Es significativamente diferente al compararlo con el control, para una  $p \leq 0,015$