

Informe final publicable de proyecto

Evaluación del estado metabólico en el daño pulmonar agudo por hiperoxia a través de microscopía intravital multifotónica y autofluorescencia.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172391

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2025

AMARELLE RUFFINATTI, Luciano (Responsable Técnico - Científico)

BLANCO, Rodrigo (Investigador)

CATTIVELLI, Andrea (Investigador)

GARCIA RIVERO, María José (Investigador)

GUERRERO, Adrian (Investigador)

HURTADO BREDDA, Francisco Javier (Investigador)

ISPER, Martin (Investigador)

MALACRIDA RODRIGUEZ, Leonel Sebastian (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \ \ FACULTAD DE MEDICINA. HOSPITAL DE CLÍNICAS

Resumen del proyecto

El oxígeno (O₂) es un elemento esencial para la vida aeróbica, no obstante también puede ser agente de daño mediado por sobreproducción de especies reactivas del O₂ (ERO). La hiperoxia -o aporte de dosis excesivas de O₂-, es muy frecuente en la clínica y tiene efectos perjudiciales que han sido reportados tanto a nivel pulmonar como sistémico, determinando incremento de la mortalidad en pacientes graves. Si bien los efectos a largo plazo de la hiperoxia son conocidos, no existe actualmente evidencia sobre las consecuencias de la exposición transitoria en el tejido pulmonar. La hiperoxia puede generar alteraciones a nivel celular en pocos minutos, no obstante los bio-marcadores disponibles están vinculados a la injuria celular establecida y no contamos con indicadores precoces de estrés tisular que identifiquen un efecto perjudicial con alta sensibilidad. En el presente proyecto hemos desarrollado y puesto a punto un modelo animal para el análisis in vivo de las consecuencias de la hiperoxia aguda en el tejido pulmonar. Nuestros resultados indican que con el protocolo de exposición utilizado no existe daño establecido, evaluado a través de la histología convencional y marcadores de lesión en lavado bronquioalveolar de ratones. Al momento, tenemos resultados alentadores en cuanto al análisis de imagen intra vital del tejido pulmonar por microscopía de dos fotones, no obstante resta por completar el proceso experimental para determinar si la hiperoxia determina cambios metabólicos en el tejido pulmonar. Conocer las alteraciones precoces por hiperoxia es fundamental para establecer un umbral seguro de exposición y prevenir la toxicidad aguda del oxígeno sobre el tejido pulmonar.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Patología / Patología pulmonar

Palabras clave: Hiperoxia / lesión pulmonar aguda / Microscopía intravital /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El oxígeno (O₂) es esencial para la vida aeróbica: la generación de energía está acoplada a la respiración celular y el O₂ actúa como aceptor final de electrones tras su paso por la cadena mitocondrial. La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) es el costo oxidativo que pagan las células por su actividad respiratoria mitocondrial. Una fuente de formación del radical superóxido (O₂•-) es la "fuga de electrones" hacia el O₂, principalmente desde los complejos I y III de la cadena mitocondrial. En condiciones normales menos del 0,2% del oxígeno es reducido a O₂•-, no obstante, esto puede incrementarse cuando existe un aporte excesivo de O₂ u otras condiciones patológicas (1). El aumento de ERO determina la acumulación de productos oxidados en biomoléculas como proteínas o lípidos, generando daño que puede comprometer la viabilidad celular y se conoce como estrés oxidativo. Las células de mamíferos poseen sistemas antioxidantes que contrarrestan este riesgo (2-4), sin embargo, cuando estos fallan o la producción de ERO sobrepasa su capacidad antioxidante, existen profundas alteraciones en la fisiología celular que son, en efecto, la base patogénica de múltiples enfermedades (5,6). En medicina, el O₂ es el pilar fundamental del tratamiento de la insuficiencia respiratoria y representa actualmente la droga más utilizada en áreas asistenciales (7,8). La hiperoxia -o aporte de dosis excesivas de oxígeno-, determina efectos perjudiciales que han sido reportados tanto a nivel pulmonar como sistémico (9-12). Los estudios en pacientes graves en ventilación mecánica (VM) sugieren que la hiperoxia determina peores resultados clínicos e incrementa la mortalidad (13-16). En distintos sub-grupos de pacientes críticos se ha observado el efecto deletéreo del aporte excesivo de O₂. Así, en la resucitación post-paro cardio-respiratorio (17,18), el infarto agudo de miocardio (19) y el shock séptico (20) ha sido demostrado el rol perjudicial de la hiperoxia. No obstante, la presencia de hiperoxia es un escenario frecuente en áreas de emergencia, anestesia y medicina intensiva (21-23). Una de las barreras que existe para lograr una terapéutica adecuada que evite sus consecuencias, es la dificultad para objetivar en el corto plazo sus efectos perjudiciales.

La lesión pulmonar aguda inducida por hiperoxia o HALI (del inglés, Hyperoxic Acute Lung Injury) ha sido bien caracterizada en modelos animales y presenta, al igual que otros tipos de injuria aguda, una fase inicial exudativa - inflamatoria, establecida luego de 24 - 72 h de exposición. En esta etapa se identifica edema intersticial y muerte celular por necrosis de células del epitelio alveolar y endoteliales (24-26). Entre las alteraciones funcionales se destaca el efecto sobre el surfactante pulmonar, con cambios en la composición fosfolipídica y en su función tenso-activa (27-30). Además del daño primario, la hiperoxia ha sido postulada como agente importante de lesión sobre-agregada a otra patología pulmonar preexistente. Este "second hit" puede incrementar significativamente el daño generado por el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) de otra causa o la lesión pulmonar asociada a la ventilación mecánica (VILI, siglas en inglés de: Ventilator-Induced Lung Injury) (31). La evidencia experimental sugiere que el daño provocado por estrés tisular se exacerba si existe hiperoxia concomitante (32). En modelos de roedores, la VM con altos volúmenes corrientes y fracción inspirada de O₂ (FiO₂) de 1, determina mayor lesión pulmonar que los ventilados con normoxia (FiO₂ de 0,21) (33-37). Estudios en humanos sometidos a hiperoxia observaron alteración en la permeabilidad alvéolo-capilar (38), peoría del intercambio de gases (39), e incremento de los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo (40). Además, otros efectos perjudiciales de aportar elevadas FiO₂ ocurren en la hipercapnia severa en pacientes con patología pulmonar crónica (41), el shunt intrapulmonar por

atelectasias (42) y la predisposición a neumonía asociada a la ventilación mecánica (43,44). La exposición a dosis elevadas de oxígeno por pocos minutos puede determinar consecuencias pulmonares y sistémicas. La evidencia existente destaca efectos vasculares con alteraciones tanto macro como micro-hemodinámicas (45–48). Sin embargo, los efectos en el tejido pulmonar de esta hiperoxia transitoria se desconocen. La evidencia disponible es sobre efectos a mediano o largo plazo (49–52), cuando el daño tisular ya está instaurado y existen diversos marcadores de lesión pulmonar aguda establecida (53,54). Actualmente no se dispone de marcadores de estrés tisular para identificar alteraciones que precedan a la lesión pulmonar, como existen por ejemplo, para la injuria renal aguda (53,55,56). La toxicidad por oxígeno determina profundas modificaciones metabólicas (26,57,58) y experimentos in vitro sugieren que la hiperoxia puede generar alteraciones a nivel celular en pocos minutos (59), afectando la cadena respiratoria mitocondrial y la fosforilación oxidativa (60,61) y comprometiendo el consumo celular de oxígeno (62) y el metabolismo glucolítico (62,63). Las coenzimas mitocondriales nicotinamida adenina dinucleótido (del inglés, nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) y flavín adenín dinucleótido (del inglés, flavin adenine dinucleotide, FADH₂) son los transportadores primarios de electrones hacia la cadena respiratoria mitocondrial. Luego de la transferencia de electrones a los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial se oxidan a NAD⁺ y FAD⁺ respectivamente (2). La relación entre las formas oxidada y reducida de NAD (NAD⁺/NADH) se correlaciona con cambios en el estado metabólico celular (64,65). La autofluorescencia de NADH se puede utilizar como marcador del estado metabólico celular, y representa una herramienta muy valiosa para evaluar el estado redox de células y tejidos (66), no obstante, a diferencia de NADH, el NAD⁺ no puede ser detectada por métodos de fluorescencia. En la células el NADH se encuentra básicamente en dos formas, unido a proteínas (protein-bound NADH) y libre (free-NADH), la relación entre estas formas se correlaciona con el índice metabólico NAD⁺/NADH (67–69). NADH es el principal aceptor de electrones en la glucólisis y dador de electrones en la fosforilación oxidativa, el descenso en el free-NADH celular evidencia un aumento de la fosforilación oxidativa, por el contrario, un cambio metabólico hacia la vía glucolítica se relaciona con un incremento de esta forma libre de NADH (68). El tiempo de vida (lifetime) es un rasgo característico de una molécula fluorescente. La cuantificación del tiempo de vida mediante microscopía [fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)] de moléculas auto-fluorescentes intracelulares permiten hacer un mapa de fluorescencia de las moléculas endógenas. Un elemento importante del análisis de tiempo de vida es su valor cuantitativo e independiente de la concentración, factor clave y no siempre considerado en los experimentos de análisis redox de la fluorescencia del NADH y FAD⁺ por intensidad. Actualmente la microscopía FLIM es ampliamente utilizada para estudiar metabolismo celular de forma no invasiva y sin necesidad de teñir la muestras con fluoróforos exógenos (label-free) (69–71). El NADH libre y unido a proteínas tienen diferentes tiempos de vida (0.4 ns y 3.4 ns, respectivamente), lo que permite diferenciar ambas formas y utilizar su relación como un índice del estado metabólico celular (72). Nuestros resultados preliminares sugieren que la ventilación mecánica con hiperoxia determina alteraciones pulmonares precoces que preceden al pico de inflamación aguda, algo hasta ahora no demostrado en períodos breves con exposición menores a 4 horas. El estrés oxidativo que determina la hiperoxia puede dañar componentes esenciales de la cadena respiratoria mitocondrial y determinar profundas alteraciones del metabolismo celular, aún en cortos períodos de exposición (26,58). En este proyecto nos proponemos profundizar el estudio de marcadores de daño pulmonar agudo por hiperoxia mediante un modelo animal, poniendo a punto el análisis por microscopía de dos fotones del índice metabólico tisular, como indicador de alteración bio-energética que precede a la injuria pulmonar establecida.

Hipótesis de investigación:

Nuestra hipótesis es que la hiperoxia por cortos periodos de tiempo determina efectos perjudiciales sobre el tejido pulmonar. Las alteraciones en el metabolismo celular pueden presentarse de forma precoz y preceder a la injuria establecida por lo que la aplicación de métodos como el análisis de relación de NADH libre y unido a proteínas por FLIM y microscopía de dos fotones permite incrementar la sensibilidad en la evaluación de las alteraciones determinadas por la hiperoxia en la fisiología pulmonar.

Objetivo general:

El objetivo general del proyecto es evaluar en un modelo experimental los efectos de la hiperoxia transitoria sobre el sistema respiratorio, analizando marcadores de daño pulmonar, respuesta inflamatoria, cambios bioquímicos, consecuencias funcionales y alteraciones bio-energéticas del tejido pulmonar.

Objetivos específicos

Poner a punto un modelo de exposición a hiperoxia durante la ventilación mecánica en ratones.

Evaluar la presencia de injuria pulmonar mediante marcadores en el LBA de ratones.

Análisis histológico de daño pulmonar y marcadores de estrés oxidativo.

Evaluar los cambios en la relación de NADH libre y unido a proteínas por FLIM y microscopía de dos fotones intravital.

Metodología/Diseño del estudio

Se desarrolló un sistema de ventilación mecánica para pequeños animales, adaptado a un mezclador de oxígeno y aire medicinal con aporte de dosis precisas de oxigenoterapia durante la ventilación mecánica. Se logró un plano anestésico óptimo con el aporte intraperitoneal de ketamina y xilazina, permitiendo estabilidad cardio respiratoria durante todo el experimento. Se adquirió

equipamiento para monitorización fisiológica de pequeños animales, como una sonda rectal con termómetro para control de la temperatura corporal y regulación de la fuente externa de calor, además se incorporó un saturómetro de pulso que permitió la monitorización continua de la saturación de oxígeno. Durante los experimentos se realizaron medidas de la mecánica ventilatoria mediante la maniobra de oclusión al final de la espiración utilizando transductores de presión y flujo en vía aérea, sistema de adquisición de señales powerLab y software labchart. Al final del experimento se realizó la eutanasia por exsanguinación y extracción de sangre intracardiaca para gasometría arterial y cuantificar la hiperoxemia resultante. Para la obtención de muestras pulmonares se puso a punto la técnica de ligado del bronquio fuente derecho y lavado bronquio alveolar (LBA) selectivo unipulmonar izquierdo, mientras que el pulmón derecho se fijó en parafina, para corte y tinción con hematoxilina - eosina para estudio histológico. El análisis de las muestras de LBA incluyó el conteo de células en las muestras frescas mediante microscopía óptica en cámara de Neubauer, la cuantificación de proteínas totales mediante técnica colorimétrica del ácido bicinonínico y de citoquinas inflamatorias como interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) mediante la utilización de un Kit de ELISA comercial. El análisis del tejido pulmonar fijado y teñido con hematoxilina y eosina se realizó mediante el software 2D-ICS-Lung desarrollado por la Ing. Micaela Lopasio de la Unidad de Bioimagenología Avanzada. En otro grupo de ratones se aplicó el mismo protocolo de anestesia y diseñó un abordaje quirúrgico de ventana torácica durante la ventilación mecánica para visualización microscopía intra vital. Para esto se fabricó una plataforma plástica con una apertura adaptable a un porta objetos que permitió adaptar el tórax del ratón en ventilación mecánica al microscopio, para obtener imágenes del tejido pulmonar en tiempo real. Para utilizar el dihidroethidium (DHE) como un marcador del estrés oxidativo resultante de la hiperoxia, se administró la droga mediante inyección intraperitoneal y visualización de los cambios a nivel del tejido pulmonar en microscopio confocal. Para el análisis de imágenes tanto de microscopía intravital como de estudio histológico convencional, se contó con el apoyo del investigador contratado, Ing. Rodrigo Blanco, quien participó en el desarrollo y utilización de sistema informático automatizado para análisis de datos de imágenes digitales.

Resultados, análisis y discusión

Uno de los principales objetivos del proyecto fue diseñar y poner a punto un novedoso modelo animal para poder estudiar el comportamiento metabólico del tejido pulmonar en el animal vivo durante la ventilación mecánica con hiperoxia. Esto representó un gran desafío, ya que si bien hay experiencia internacional en órganos sólidos como hígado y riñón, el tejido pulmonar en el animal vivo tiene movimientos ventilatorios que dificultan la adquisición de imágenes. Se logró la visualización microscópica en tiempo real del tejido pulmonar de ratones anestesiados y en ventilación mecánica gracias al diseño de un set up experimental que permitió adaptar al animal vivo a una plataforma de microscopía (Figura 1). Se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal pulmonar con resolución de nivel alveolar, utilizando la autofluorescencia del tejido pulmonar, pudiendo identificar in vivo estructuras alveolares y sus componentes celulares, vasos sanguíneos y sectores de pequeña vía aérea (Figura 2). Otro resultado fundamental en la puesta a punto del modelo fue el estudio piloto con DHE, en el que se logró visualizar la distribución de este componente en el tejido pulmonar luego de la inyección intra peritoneal en ratones control, permitiendo optimizar la técnica para el uso luego de exposición a hiperoxia (Figuras 3 y 4).

Análisis de la inflamación y daño pulmonar: En el estudio histológico de los cortes de tejido pulmonar se cuantificó el grosor de tabique alveolar y el espacio aéreo de los ratones WT sometidos a ventilación mecánica con y sin hiperoxia, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros de daño histológico (Figura 5). En el estudio bioquímico de las muestras de LBA no encontramos diferencias entre ratones con hiperoxia y control en el número total de células, ni en la cuantificación de proteínas totales del LBA (Figuras 6 y 7). El análisis de citoquinas pro inflamatorias, no se observaron diferencias en la concentración de TNF- α en LBA, mientras que en la cuantificación de IL-6 observamos una tendencia al aumento en el grupo hiperoxia, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figuras 8 y 9). Estos resultados observados hasta el momento están dentro de lo esperado, nuestra hipótesis de trabajo es que la hiperoxia por corto período de tiempo determina cambios a nivel tisular y celular pulmonar, que preceden al daño estructural establecido. Es fundamental para el proyecto completar los datos experimentales de los cambios metabólicos mediante microscopía de dos fotones in vivo, que por problemas técnicos del microscopio, con daño del láser, no pudimos completar. El equipo actualmente se encuentra reparado y en pleno funcionamiento, por lo que es de esperar que podamos en corto plazo tener los resultados de este objetivo específico, dado que el modelo ya fue puesto a punto y contamos con resultados preliminares alentadores. Esperamos encontrar cambios en el estrés oxidativo con la formación de 2-Hydroxyetidium (2-OH-E+) y del metabolismo del tejido pulmonar a través de la autofluorescencia del NADH y NADH libre que confirmen nuestra hipótesis de trabajo.

Conclusiones y recomendaciones

El presente proyecto tuvo como propósito profundizar en la comprensión de los efectos tempranos de la hiperoxia sobre el tejido pulmonar, particularmente en el contexto de la ventilación mecánica. A pesar de que el oxígeno constituye un recurso terapéutico esencial en la práctica clínica, existe creciente evidencia de que su administración en concentraciones elevadas puede inducir efectos deletéreos tanto a nivel pulmonar como sistémico. Sin embargo, gran parte del conocimiento disponible se centra en etapas tardías del daño pulmonar, cuando los procesos inflamatorios y estructurales ya están establecidos. En este sentido, la principal

contribución de este trabajo radica en abordar el período precoz de exposición a hiperoxia, explorando la hipótesis de que las alteraciones metabólicas y bioenergéticas preceden al desarrollo de la lesión pulmonar aguda manifiesta.

Uno de los logros más relevantes del proyecto fue el desarrollo y validación de un modelo experimental de ventilación mecánica en ratones que permite administrar fracciones inspiradas de oxígeno con precisión y evaluar en tiempo real la fisiología pulmonar. La implementación de este sistema implicó la integración de diversas herramientas de monitorización fisiológica, medición de la mecánica respiratoria y adquisición de señales, así como el diseño de un abordaje quirúrgico que posibilitó la observación microscópica intravital del pulmón en animales anestesiados y ventilados. Este avance metodológico resulta particularmente significativo, dado que el estudio del pulmón in vivo presenta desafíos técnicos considerables debido al movimiento respiratorio y a las características anatómicas del tejido pulmonar. La obtención de imágenes con resolución alveolar mediante microscopía confocal y la visualización de estructuras celulares, vasculares y de pequeña vía aérea constituyen un aporte relevante para futuras investigaciones en fisiología pulmonar y medicina crítica experimental.

En relación con los objetivos orientados a evaluar marcadores clásicos de lesión pulmonar, los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales sometidos a ventilación mecánica con hiperoxia y los controles en parámetros histológicos ni en los principales marcadores bioquímicos analizados en el lavado broncoalveolar. Específicamente, no se observaron cambios relevantes en el grosor del tabique alveolar, el espacio aéreo, el recuento celular ni en la concentración de proteínas totales. Asimismo, los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- α no mostraron variaciones significativas entre los grupos experimentales. Si bien se identificó una tendencia al aumento de interleuquina-6 en el grupo expuesto a hiperoxia, esta diferencia no alcanzó significación estadística. Estos hallazgos son coherentes con la hipótesis planteada inicialmente, que propone que períodos breves de hiperoxia no necesariamente generan alteraciones estructurales detectables mediante métodos histológicos convencionales ni desencadenan una respuesta inflamatoria marcada en las etapas más tempranas de exposición.

En este contexto, los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de emplear herramientas más sensibles que permitan detectar modificaciones funcionales y metabólicas precoces en el tejido pulmonar. El desarrollo del modelo experimental y la implementación de técnicas de microscopía intravital representan un paso fundamental para avanzar en esta dirección. Particularmente, el análisis del metabolismo celular mediante la evaluación de la autofluorescencia del NADH y la relación entre sus formas libre y unida a proteínas mediante microscopía de dos fotones y técnicas de fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) constituye una estrategia prometedora para identificar alteraciones bioenergéticas tempranas asociadas al estrés oxidativo inducido por hiperoxia. La evidencia experimental sugiere que estas modificaciones metabólicas pueden ocurrir en escalas temporales muy breves, afectando procesos centrales como la fosforilación oxidativa mitocondrial y el equilibrio redox celular.

Si bien dificultades técnicas asociadas al funcionamiento del equipo de microscopía impidieron completar durante el período del proyecto el análisis metabólico mediante FLIM, la reparación y puesta en funcionamiento del sistema permite prever la obtención de estos datos en el corto plazo. La disponibilidad de un modelo experimental ya optimizado y de resultados preliminares alentadores proporciona una base sólida para continuar esta línea de investigación y profundizar en la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la toxicidad por oxígeno.

En conjunto, los resultados del proyecto sugieren que la exposición breve a hiperoxia durante la ventilación mecánica no produce, en etapas iniciales, signos evidentes de lesión pulmonar estructural ni una respuesta inflamatoria significativa detectable mediante marcadores tradicionales. No obstante, estos hallazgos no descartan la presencia de alteraciones subcelulares o metabólicas tempranas que precedan al daño tisular establecido. Por lo tanto, la incorporación de herramientas avanzadas de bioimagen y análisis metabólico resulta esencial para comprender de manera más completa los efectos precoces de la hiperoxia sobre el tejido pulmonar. Este conocimiento podría contribuir en el futuro al desarrollo de marcadores tempranos de estrés tisular y a la optimización de las estrategias de administración de oxígeno en pacientes críticos, con el objetivo de maximizar sus beneficios terapéuticos y minimizar sus potenciales efectos adversos.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Novel opportunities from bioimaging to understand the trafficking and maturation of intracellular pulmonary surfactant and its role in lung diseases	María José Garcia, Luciano Amarelle, Leonel Malacrida, Arturo Briva	https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1250350	https://hdl.handle.net/20.500.12008/52714	Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):5839–48. doi:10.1073/pnas.1804932115 PubMed PMID: 29802228; PubMed Central PMCID: PMC6003358.
2. Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb;19(2):77–92. doi:10.1038/nrm.2017.66 PubMed PMID: 28792006.
3. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018 Jun 4;217(6):1915–28. doi:10.1083/jcb.201708007 PubMed PMID: 29669742; PubMed Central PMCID: PMC5987716.
4. Kruk J, Aboul-Enein HY, Kladna A, Bowser JE. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radic Res*. 2019 May;53(5):497–521. doi:10.1080/10715762.2019.1612059 PubMed PMID: 31039624.
5. Larosa V, Remacle C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*. 2018 Oct 31;38(5):BSR20171492. doi:10.1042/BSR20171492 PubMed PMID: 30201689; PubMed Central PMCID: PMC6167499.
6. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757–72. doi:10.2147/CIA.S158513 PubMed PMID: 29731617; PubMed Central PMCID: PMC5927356.
7. O'Driscoll BR, Howard LS, Bucknall C, Welham SA, Davison AG. British Thoracic Society emergency oxygen audits. *Thorax*. 2011 Aug;66(8):734–5. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200078 PubMed PMID: 21502096.
8. O'Driscoll BR, Smith R. Oxygen Use in Critical Illness. *Respir Care*. 2019 Oct;64(10):1293–307. doi:10.4187/respcare.07044 PubMed PMID: 31409632.
9. Hafner S, Beloncle F, Koch A, Radermacher P, Asfar P. Hyperoxia in intensive care, emergency, and peri-operative medicine: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? A 2015 update. *Ann Intensive Care*. 2015 Dec;5(1):42. doi:10.1186/s13613-015-0084-6 PubMed PMID: 26585328; PubMed Central PMCID: PMC4653126.
10. Helmerhorst HJF, Roos-Blom MJ, Van Westerloo DJ, De Jonge E. Association Between Arterial Hyperoxia and Outcome in Subsets of Critical Illness: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression of Cohort Studies*. *Crit Care Med*. 2015 Jul;43(7):1508–19. doi:10.1097/CCM.0000000000000998
11. Damiani E, Donati A, Girardis M. Oxygen in the critically ill: friend or foe? *Curr Opin Anaesthesiol*. 2018 Apr;31(2):129–35. doi:10.1097/ACO.0000000000000559
12. Shankar P, Robson SC, Otterbein LE, Shaefi S. Clinical Implications of Hyperoxia. *Int Anesthesiol Clin*. 2018;56(1):68–79. doi:10.1097/AIA.0000000000000176

13. Girardis M, Busani S, Damiani E, Donati A, Rinaldi L, Marudi A, et al. Effect of Conservative vs Conventional Oxygen Therapy on Mortality Among Patients in an Intensive Care Unit: The Oxygen-ICU Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Oct 18;316(15):1583–9. doi:10.1001/jama.2016.11993
14. De Jonge E, Peelen L, Keijzers PJ, Joore H, De Lange D, Van Der Voort PH, et al. Association between administered oxygen, arterial partial oxygen pressure and mortality in mechanically ventilated intensive care unit patients. *Crit Care*. 2008 Dec 10;12(6):R156. doi:10.1186/cc7150
15. Page D, Ablordeppey E, Wessman BT, Mohr NM, Trzeciak S, Kollef MH, et al. Emergency department hyperoxia is associated with increased mortality in mechanically ventilated patients: a cohort study. *Crit Care*. 2018 Dec;22(1):9. doi:10.1186/s13054-017-1926-4
16. Chu DK, Kim LHY, Young PJ, Zamiri N, Almenawer SA, Jaeschke R, et al. Mortality and morbidity in acutely ill adults treated with liberal versus conservative oxygen therapy (IOTA): a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2018 Apr;391(10131):1693–705. doi:10.1016/S0140-6736(18)30479-3
17. Helmerhorst HJF, Schultz MJ, van der Voort PHJ, de Jonge E, van Westerloo DJ. Bench-to-bedside review: the effects of hyperoxia during critical illness. *Crit Care Lond Engl*. 2015 Aug 17;19(1):284. doi:10.1186/s13054-015-0996-4 PubMed PMID: 26278383; PubMed Central PMCID: PMC4538738.
18. Roberts BW, Kilgannon JH, Hunter BR, Puskarich MA, Pierce L, Donnino M, et al. Association Between Early Hyperoxia Exposure After Resuscitation From Cardiac Arrest and Neurological Disability: Prospective Multicenter Protocol-Directed Cohort Study. *Circulation*. 2018 May 15;137(20):2114–24. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032054
19. Stub D, Smith K, Bernard S, Nehme Z, Stephenson M, Bray JE, et al. Air Versus Oxygen in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation*. 2015 Jun 16;131(24):2143–50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014494 PubMed PMID: 26002889.
20. Asfar P, Schortgen F, Boissramé-Helms J, Charpentier J, Guérot E, Megarbane B, et al. Hyperoxia and hypertonic saline in patients with septic shock (HYPER2S): a two-by-two factorial, multicentre, randomised, clinical trial. *Lancet Respir Med*. 2017 Mar;5(3):180–90. doi:10.1016/S2213-2600(17)30046-2
21. Helmerhorst HJ, Schultz MJ, Van Der Voort PH, Bosman RJ, Juffermans NP, De Jonge E, et al. Self-reported attitudes versus actual practice of oxygen therapy by ICU physicians and nurses. *Ann Intensive Care*. 2014 Dec;4(1):23. doi:10.1186/s13613-014-0023-y
22. Acordagoitia C, Ispier M, Leguisamo A, Lorenzo JG, Lores P, Luna P, et al. Prevalencia de hiperoxemia en unidades de cuidados intensivos polivalentes de Montevideo, Uruguay. *An Fac Med [Internet]*. 2021 Sep 2 [cited 2026 Feb 26];8(s2). Available from: <https://revistas.udelar.edu.uy/OJS/index.php/anfamed/article/view/329>
23. de Graaff AE, Dongelmans DA, Binnekade JM, de Jonge E. Clinicians' response to hyperoxia in ventilated patients in a Dutch ICU depends on the level of FiO₂. *Intensive Care Med*. 2011 Jan 1;37(1):46–51. doi:10.1007/s00134-010-2025-z
24. Crapo JD. Morphologic Changes in Pulmonary Oxygen Toxicity. *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews; 1986. p. 721–31. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.48.030186.003445>
25. Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury. *Respir Care*. 2013 Jan;58(1):123–41. doi:10.4187/respcare.01963 PubMed PMID: 23271823; PubMed Central PMCID: PMC3915523.
26. Dias-Freitas F, Metelo-Coimbra C, Roncon-Albuquerque RJ. Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury. *Respir Med*. 2016 Oct;119:23–8. doi:10.1016/j.rmed.2016.08.010 PubMed PMID: 27692143.
27. Holm BA, Notter RH, Siegle J, Matalon S. Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1985 Nov;59(5):1402–9. doi:10.1152/jappl.1985.59.5.1402 PubMed PMID: 3840800.
28. Bailey TC, Cavanagh C, Mehta S, Lewis JF, Veldhuizen RAW. Sepsis and hyperoxia effects on the pulmonary surfactant system in wild-type and iNOS knockout mice. *Eur Respir J*. 2002 Jul;20(1):177–82. doi:10.1183/09031936.02.00276702 PubMed PMID: 12166567.
29. Zenri H, Rodriguez-Capote K, McCaig L, Yao LJ, Brackenbury A, Possmayer F, et al. Hyperoxia exposure impairs surfactant function and metabolism. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5):1155–60. doi:10.1097/01.ccm.0000126264.00551.c8 PubMed PMID: 15190966.
30. Smallwood CD, Boloori-Zadeh P, Silva MR, Gouldstone A. High Oxygen Concentrations Adversely Affect the Performance of Pulmonary Surfactant. *Respir Care*. 2017 Aug;62(8):1085–90. doi:10.4187/respcare.05388 PubMed PMID: 28588116.
31. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999 Jul;116(1 Suppl):9S-15S. doi:10.1378/chest.116.suppl_1.9s-a PubMed PMID: 10424561.
32. Jones CI 3rd, Han Z, Presley T, Varadharaj S, Zweier JL, Ilangovan G, et al. Endothelial cell respiration is affected by the oxygen tension during shear exposure: role of mitochondrial peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jul;295(1):C180-191. doi:10.1152/ajpcell.00549.2007 PubMed PMID: 18480296; PubMed Central PMCID: PMC2493556.
33. Amarelle L, Quintela L, Hurtado J, Malacrida L. Hyperoxia and Lungs: What We Have Learned From Animal Models. *Front Med*. 2021;8:606678. doi:10.3389/fmed.2021.606678 PubMed PMID: 33768102; PubMed Central PMCID: PMC7985075.
34. Quinn DA, Moufarrej RK, Volokhov A, Hales CA. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Aug;93(2):517–25. doi:10.1152/japplphysiol.00570.2001 PubMed PMID: 12133859.
35. Bailey TC, Martin EL, Zhao L, Veldhuizen RAW. High oxygen concentrations predispose mouse lungs to the deleterious effects of high stretch ventilation. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2003 Mar;94(3):975–82. doi:10.1152/japplphysiol.00619.2002 PubMed PMID: 12571129.
36. Sinclair SE, Altemeier WA, Matute-Bello G, Chi EY. Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical

- ventilation. *Crit Care Med*. 2004 Dec;32(12):2496–501. doi:10.1097/01.ccm.0000148231.04642.8d PubMed PMID: 15599157.
37. Makena PS, Luellen CL, Balazs L, Ghosh MC, Parthasarathi K, Waters CM, et al. Preexposure to hyperoxia causes increased lung injury and epithelial apoptosis in mice ventilated with high tidal volumes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Nov;299(5):L711–719. doi:10.1152/ajplung.00072.2010 PubMed PMID: 20833778; PubMed Central PMCID: PMC2980385.
 38. Davis WB, Rennard SI, Bitterman PB, Crystal RG. Pulmonary oxygen toxicity. Early reversible changes in human alveolar structures induced by hyperoxia. *N Engl J Med*. 1983 Oct 13;309(15):878–83. doi:10.1056/NEJM198310133091502 PubMed PMID: 6888481.
 39. Rachmale S, Li G, Wilson G, Malinchoc M, Gajic O. Practice of excessive F(I_O(2)) and effect on pulmonary outcomes in mechanically ventilated patients with acute lung injury. *Respir Care*. 2012 Nov;57(11):1887–93. doi:10.4187/respcare.01696 PubMed PMID: 22613692.
 40. Ottolenghi S, Rubino FM, Sabbatini G, Coppola S, Veronese A, Chiumello D, et al. Oxidative Stress Markers to Investigate the Effects of Hyperoxia in Anesthesia. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 4;20(21). doi:10.3390/ijms20215492 PubMed PMID: 31690051; PubMed Central PMCID: PMC6862279.
 41. Sassoon CS, Hassell KT, Mahutte CK. Hyperoxic-induced hypercapnia in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Apr;135(4):907–11. doi:10.1164/arrd.1987.135.4.907 PubMed PMID: 3565937.
 42. Rothen HU, Sporre B, Engberg G, Wegenius G, Reber A, Hedenstierna G. Prevention of atelectasis during general anaesthesia. *Lancet Lond Engl*. 1995 Jun 3;345(8962):1387–91. doi:10.1016/s0140-6736(95)92595-3 PubMed PMID: 7760608.
 43. Six S, Jaffal K, Ledoux G, Jaillette E, Wallet F, Nseir S. Hyperoxemia as a risk factor for ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Lond Engl*. 2016 Jun 22;20(1):195. doi:10.1186/s13054-016-1368-4 PubMed PMID: 27334713; PubMed Central PMCID: PMC4917974.
 44. Six S, Rouzé A, Pouly O, Poissy J, Wallet F, Preau S, et al. Impact of hyperoxemia on mortality in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Ann Transl Med*. 2018 Nov;6(21):417. doi:10.21037/atm.2018.10.19 PubMed PMID: 30581825; PubMed Central PMCID: PMC6275410.
 45. Fumagalli M, Mosca F, Knudsen GM, Greisen G. Transient hyperoxia and residual cerebrovascular effects in the newborn rat. *Pediatr Res*. 2004 Mar;55(3):380–4. doi:10.1203/01.PDR.0000111203.61629.98 PubMed PMID: 14681497.
 46. Melsom MN, Flatebø T, Nicolaysen G. Hypoxia and hyperoxia both transiently affect distribution of pulmonary perfusion but not ventilation in awake sheep. *Acta Physiol Scand*. 1999 Jun;166(2):151–8. doi:10.1046/j.1365-201x.1999.00553.x PubMed PMID: 10383495.
 47. Nijima S, Shortland DB, Levene MI, Evans DH. Transient hyperoxia and cerebral blood flow velocity in infants born prematurely and at full term. *Arch Dis Child*. 1988 Oct;63(10 Spec No):1126–30. doi:10.1136/adc.63.10_spec_no.1126 PubMed PMID: 3196067; PubMed Central PMCID: PMC1590204.
 48. Tsai AG, Cabrales P, Winslow RM, Intaglietta M. Microvascular oxygen distribution in awake hamster window chamber model during hyperoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Oct;285(4):H1537–1545. doi:10.1152/ajpheart.00176.2003 PubMed PMID: 12805029.
 49. Sepehr R, Staniszewski K, Maleki S, Jacobs ER, Audi S, Ranji M. Optical imaging of tissue mitochondrial redox state in intact rat lungs in two models of pulmonary oxidative stress. *J Biomed Opt*. 2012 Apr;17(4):046010. doi:10.1117/1.JBO.17.4.046010 PubMed PMID: 22559688; PubMed Central PMCID: PMC3380956.
 50. Sepehr R, Audi SH, Staniszewski KS, Haworth ST, Jacobs ER, Ranji M. Novel Fluorometric Tool to Assess Mitochondrial Redox State of Isolated Perfused Rat Lungs after Exposure to Hyperoxia. *IEEE J Transl Eng Health Med*. 2013 Oct 16;1:1500210. doi:10.1109/JTEHM.2013.2285916 PubMed PMID: 25379360; PubMed Central PMCID: PMC4219590.
 51. Ma C, Beyer AM, Durand M, Clough AV, Zhu D, Norwood Toro L, et al. Hyperoxia Causes Mitochondrial Fragmentation in Pulmonary Endothelial Cells by Increasing Expression of Pro-Fission Proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Mar;38(3):622–35. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310605 PubMed PMID: 29419407; PubMed Central PMCID: PMC5823793.
 52. Kundumani-Sridharan V, Subramani J, Raghavan S, Maiti GP, Owens C, Walker T, et al. Short-duration hyperoxia causes genotoxicity in mouse lungs: protection by volatile anesthetic isoflurane. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 May 1;316(5):L903–17. doi:10.1152/ajplung.00142.2018 PubMed PMID: 30810065; PubMed Central PMCID: PMC6589579.
 53. Blondonnet R, Constantin JM, Sapin V, Jabaudon M. A Pathophysiologic Approach to Biomarkers in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Dis Markers*. 2016;2016:3501373. doi:10.1155/2016/3501373 PubMed PMID: 26980924; PubMed Central PMCID: PMC4766331.
 54. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379–399. doi:10.1152/ajplung.00010.2008 PubMed PMID: 18621912; PubMed Central PMCID: PMC2536793.
 55. Spadaro S, Park M, Turrini C, Tunstall T, Thwaites R, Mauri T, et al. Biomarkers for Acute Respiratory Distress syndrome and prospects for personalised medicine. *J Inflamm Lond Engl*. 2019;16:1. doi:10.1186/s12950-018-0202-y PubMed PMID: 30675131; PubMed Central PMCID: PMC6332898.
 56. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, Küllmar M, Kellum JA, Schmit D, et al. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet Lond Engl*. 2019 Aug 10;394(10197):488–96. doi:10.1016/S0140-6736(19)30769-X PubMed PMID: 31202596.
 57. Gardner PR, Nguyen DD, White CW. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):12248–52. doi:10.1073/pnas.91.25.12248 PubMed PMID: 7991614; PubMed Central PMCID: PMC45414.
 58. Chandel NS, Budinger GRS. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jan 15;42(2):165–74.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.048 PubMed PMID: 17189822.

59. Odoms K, Shanley TP, Wong HR. Short-term modulation of interleukin-1 β signaling by hyperoxia: uncoupling of IkappaB kinase activation and NF-kappaB-dependent gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Mar;286(3):L554-562. doi:10.1152/ajplung.00191.2003 PubMed PMID: 14617515.

60. Ma Z, Moruzzi N, Catrina SB, Grill V, Björklund A. Hyperoxia inhibits glucose-induced insulin secretion and mitochondrial metabolism in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 3;443(1):223-8. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.088 PubMed PMID: 24299957.

61. Hals I, Ohki T, Singh R, Ma Z, Björklund A, Balasuriya C, et al. Hyperoxia reduces insulin release and induces mitochondrial dysfunction with possible implications for hyperoxic treatment of neonates. *Physiol Rep*. 2017 Oct 1;5(19):e13447. doi:10.14814/phy2.13447

62. Das KC. Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria. *PLoS One*. 2013;8(9):e73358. doi:10.1371/journal.pone.0073358 PubMed PMID: 24023862; PubMed Central PMCID: PMC3759456.

63. Tanaka K, Watanabe T, Ozawa J, Ito M, Nagano N, Arai Y, et al. Difference in pyruvic acid metabolism between neonatal and adult mouse lungs exposed to hyperoxia. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238604. doi:10.1371/journal.pone.0238604 PubMed PMID: 32881962; PubMed Central PMCID: PMC7470327.

64. Winkler U, Hirrlinger J. Crosstalk of Signaling and Metabolism Mediated by the NAD(+)/NADH Redox State in Brain Cells. *Neurochem Res*. 2015 Dec;40(12):2394-401. doi:10.1007/s11064-015-1526-0 PubMed PMID: 25876186.

65. Köhler S, Winkler U, Sicker M, Hirrlinger J. NDCe1 mediates the regulation of the NADH/NAD(+) redox state in cortical astrocytes by neuronal signals. *Glia*. 2018 Oct;66(10):2233-45. doi:10.1002/glia.23504 PubMed PMID: 30208253.

66. Stringari C, Cinquin A, Cinquin O, Digman MA, Donovan PJ, Gratton E. Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13582-7. doi:10.1073/pnas.1108161108 PubMed PMID: 21808026; PubMed Central PMCID: PMC3158156.

67. Wright BK, Andrews LM, Markham J, Jones MR, Stringari C, Digman MA, et al. NADH distribution in live progenitor stem cells by phasor-fluorescence lifetime image microscopy. *Biophys J*. 2012 Jul 3;103(1):L7-9. doi:10.1016/j.bpj.2012.05.038 PubMed PMID: 22828352; PubMed Central PMCID: PMC3388207.

68. Stringari C, Nourse JL, Flanagan LA, Gratton E. Phasor fluorescence lifetime microscopy of free and protein-bound NADH reveals neural stem cell differentiation potential. *PLoS One*. 2012;7(11):e48014. doi:10.1371/journal.pone.0048014 PubMed PMID: 23144844; PubMed Central PMCID: PMC3489895.

69. Aguilar-Arnal L, Ranjit S, Stringari C, Orozco-Solis R, Gratton E, Sassone-Corsi P. Spatial dynamics of SIRT1 and the subnuclear distribution of NADH species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Nov 8;113(45):12715-20. doi:10.1073/pnas.1609227113 PubMed PMID: 27791113; PubMed Central PMCID: PMC5111721.

70. Stringari C, Sierra R, Donovan PJ, Gratton E. Label-free separation of human embryonic stem cells and their differentiating progenies by phasor fluorescence lifetime microscopy. *J Biomed Opt*. 2012 Apr;17(4):046012. doi:10.1117/1.JBO.17.4.046012 PubMed PMID: 22559690; PubMed Central PMCID: PMC3381030.

71. Ma N, Digman MA, Malacrida L, Gratton E. Measurements of absolute concentrations of NADH in cells using the phasor FLIM method. *Biomed Opt Express*. 2016 Jul 1;7(7):2441-52. doi:10.1364/BOE.7.002441 PubMed PMID: 27446681; PubMed Central PMCID: PMC4948605.

72. Ranjit S, Malacrida L, Stakic M, Gratton E. Determination of the metabolic index using the fluorescence lifetime of free and bound nicotinamide adenine dinucleotide using the phasor approach. *J Biophotonics*. 2019 Nov;12(11):e201900156. doi:10.1002/jbio.201900156 PubMed PMID: 31194290; PubMed Central PMCID: PMC6842045.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

