



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Neuroprotección mediante terapia combinada (Hipotermia+Alopurinol) en un modelo animal de daño cerebral hipóxico-isquémico

Javier Rodríguez Fanjul

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Neuroprotección mediante terapia combinada (hipotermia + alopurinol) en un modelo animal de daño cerebral hipóxico-ischémico

Javier Rodríguez Fanjul

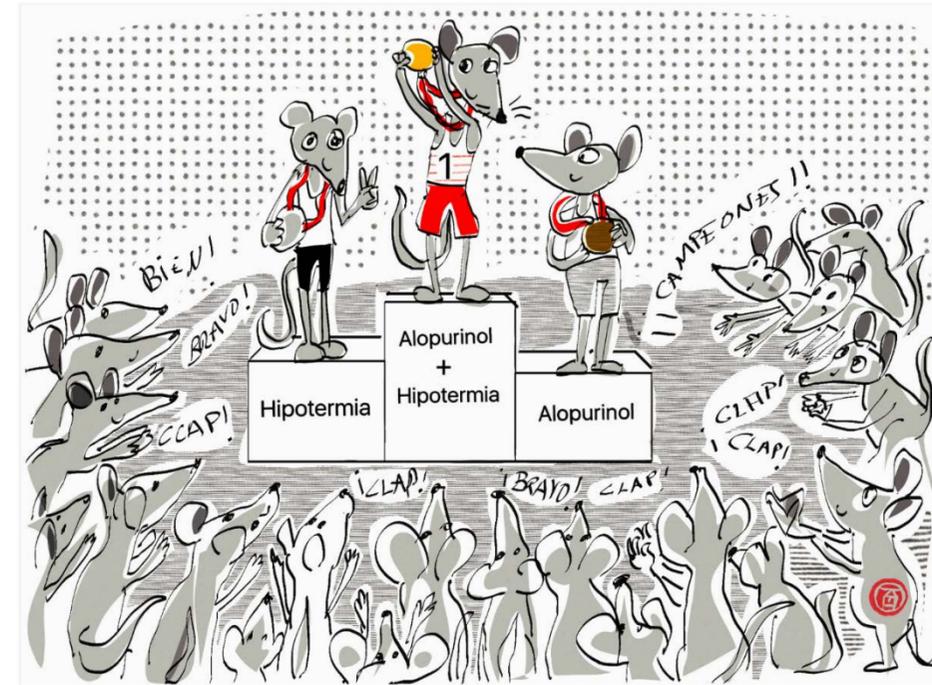


UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

Neuroprotección mediante terapia combinada
(hipotermia + alopurinol) en un modelo animal
de daño cerebral hipóxico-ischémico



Doctorando: Javier Rodríguez Fanjul

Directora: Marta Camprubí Camprubí



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

**Neuroprotección mediante terapia combinada
(Hipotermia+Alopurinol) en un modelo animal de
daño cerebral hipóxico-isquémico**

Javier Rodríguez Fanjul

**Neuroprotección mediante terapia
combinada (Hipotermia+Alopurinol) en un
modelo animal de daño cerebral hipóxico-
isquémico**

Tesi Doctoral presentada por
Javier Rodríguez Fanjul
para optar al título de Doctor en Medicina
por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección de la Dra. Marta Camprubí Camprubí y la
tutorización del Dr. Alfredo García-Álix, Servicio de Neonatología. Hospital Sant
Joan de Déu (Universitat de Barcelona).

Línea de investigación:

*Fisiopatología enfermedades fetales y pediátricas (Departament d'Obstetrícia-Ginecologia, Pediatria,
Radiologia i Anatomia). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.*

Informe Directora de la Tesis

Barcelona, octubre de 2017

La directora de la tesis, Dra. Marta Camprubí Camprubí.

CERTIFICA que la Tesis Doctoral titulada *“Neuroprotección mediante terapia combinada (Hipotermia+Alopurinol) en un modelo animal de daño cerebral hipóxico-isquémico”* presentada por Javier Rodríguez Fanjul para la obtención del grado de Doctor en Medicina por la Universitat de Barcelona cumple todos los requisitos administrativos y académicos para ser sometida a su defensa delante de la correspondiente comisión y,

CERTIFICA que los artículos presentados en esta tesis:

Article 1. A new technique for collection of cerebrospinal fluid in rat pups. J Exp Neurosci. 2015;24:9:37-41.

Article 2. Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question?. Plos One. 2017;12(9):e0184643.

Pertenecen a una misma temática, que el doctorando es el primer autor de las publicaciones, que están publicadas en revistas indexadas, encontrándose el segundo artículo en el primer cuartil del área de conocimiento y que no forman parte de ninguna otra tesis doctoral.

Dra. Marta Camprubí Camprubí

Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en forma de artículos en revistas científicas. Dichos artículos se encuentran incluidos al final de esta tesis doctoral y han recibido financiación de Bebedue (Santa Perpetura de Moguda, Barcelona) y del Ministerio de Economía y Competitividad (BFY2014-55373-R) y de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1178).

Las entidades de financiación no han tenido ningún papel en el diseño del estudio, recogida ni análisis de los datos, ni en las decisiones sobre su publicación.

Los resultados de este trabajo han sido parcialmente presentados como comunicaciones en las siguientes reuniones científicas.

- 54 European Society for Paediatric Research. Oporto. 2013
- XXIV Congreso de Neonatología y Medicina Perinatal. Barcelona. 2013
- 5th congress of the European Academy of Paediatric Societies. Barcelona. 2014
- II Jornadas de investigación de medicina perinatal. Madrid. 2014
- 6th Congress of the European Academy of Paediatric Societies (EAPS). Geneva. 2016
- 6th International Congress of Union European and Neonatal Societies (UENPS).Valencia. 2016
- XXVI Congreso de Neonatología y Medicina perinatal. Zaragoza. 2017

El mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subirla.

(Gabriel García-Márquez)

AGRADECIMIENTOS

A Raquel por querer ser mi compañera en este viaje, por aguantarme en mis defectos y manías y por ayudarme a escalar esta y otras tantas cimas.

A Lucas por cambiar mi vida, por ser una fuente inagotable de sonrisas y energía.

A mis padres por todo el esfuerzo que han hecho para que yo haya podido llegar hasta aquí y convertirme en el que soy hoy, gracias.

A mi hermano Albert por estar en la distancia.

A la Dra. Marta Camprubí, directora de la meva tesis, amiga i germana gran. Moltes gràcies per confiar en mi quan ningú més ho va fer, per la teva infinita paciència i per els teus consells, mai et podré estar prou agraït.

Al Dr. Alfredo García-Alix, tutor de mi tesis, por contagiarme su entusiasmo por la neonatología.

Al Dr. Xavier Krauel por su incansable apoyo, entusiasmo, energía y por su mente maravillosa capaz de contagiar a la gente de su alrededor.

A todo el personal del estabulario y laboratorio de Sant Joan de Déu, muy especialmente a Isabel Salas por su infinita paciencia y a Nuria Villalmazo, Miriam Lopez y Maria Goretti Lopez Ramos por su colaboración técnica.

A Gemma Fernandez de audiovisuales por su inestimable ayuda en la maquetación.

Al Servicio de Neonatología, y a su jefe el dr. Martín Iriondo, por adoptarme estos años, incluyendo a todos los médicos, residentes, personal de enfermería y auxiliares, padres y pacientes, con una mención

especial al Dr. Julio Moreno que me ha enseñado a ser un mejor médico y sobre todo a ser una mejor persona; así como también

a la Dra. Beatriz del Rey y al Dr. Albert Batista por estar siempre ahí cuando los he necesitado, por su amistad y por muchas otras cosas más que no se pueden escribir en dos líneas.

Al Servicio de Intensivos Pediátricos por todas sus enseñanzas, y en especial a las Dras Iolanda Jordan, Monica Balaguer por ayudarme y aconsejarme todos estos años y por contar siempre conmigo y por estar ahí.

Al servicio de Transporte Pediátrico de Emergencias Médicas, en especial a la Dra. Elisabeth Esteban por darme esta inmensa oportunidad, y también todo el equipo de técnicos y enfermería por enseñarme lo que es un equipo con mayúsculas.

A los servicio de Cardiología y Pediatría, en especial a los Drs. Carles Bautista y Sergi Navarro, por ser un referente tanto dentro del trabajo como fuera de el y por ser mis amigos en los buenos y malos momentos.

A todos mis R mayores y pequeños, en especial a mi amiga la Dra. Cristina Durán que con quien empezó este viaje hace unos años a ritmo de tortuguitas y ha seguido en la distancia, moitas grazas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Concepto y definición de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI).....	2
1.2 Epidemiología de la EHI. Incidencia y factores asociados.....	3
1.3 Fisiopatología de la EHI.....	5
1.4 Papel del daño oxidativo en la lesión cerebral por hipoxia-isquemia (HI).....	8
1.5 Modelos animales de HI.....	13
1.6 Hipotermia moderada o sostenida terapéutica como tratamiento en la EHI..	13
1.6.1 Historia tratamiento: hipotermia moderada.....	13
1.6.2 Hipotermia y modelos animales.....	16
1.6.3 Mecanismos neuroprotectores de la hipotermia.....	19
1.6.4 Duración tratamiento con hipotermia.....	22
1.7 Otras estrategias neuroprotectoras.....	23
1.8 Alopurinol.....	27
1.8.1 Alopurinol como neuroprotector.....	27
1.8.2 Alopurinol en el recién nacido con EHI.....	32
1.9 Neuroprotección y diferencias según sexo.....	36
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
3.1 Animales y estabularización.....	44
3.2 Diseño experimental. Esquema de trabajo.....	45
3.2.1 Grupos estudio.....	47
3.2.2 Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica.....	50
3.2.3 Tratamiento con hipotermia.....	50
3.2.4 Tratamiento con alopurinol.....	50
3.3 Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR). Valoración biológica (biomarcadores).....	52
3.3.1 Extracción de LCR mediante punción de cisterna magna.....	52
3.3.2 Determinación de biomarcadores en LCR.....	52
3.4 Valoración de las diferentes vías de activación de la apoptosis.....	54
3.4.1 Medición actividad de la caspasa-3.....	54
3.5 Valoración daño histológico (tamaño del infarto, tamaño hipocampo, score neuropatológico).....	56

3.6 Evaluación funcional motora y del aprendizaje.....	58
3.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	61
4. RESULTADOS.....	64
4.1 Flujo de animales utilizados en los diferentes experimentos.....	65
4.2 Obtención de líquido cefaloraquídeo.....	66
4.3 Evaluación de los tratamientos aplicados después de una agresión HI.....	68
5. DISCUSIÓN.....	86
5.1 Modelo animal HI: idoneidad y peculiaridades.....	87
5.2 Modelo animal y hipotermia.....	98
5.3 Modelo animal y edad gestacional. Diferencias en el tipo de lesión. Importancia de la edad gestacional en la elección del modelo.....	101
5.4 Valoración de la lesión cerebral a nivel histológico en los modelos de HI.....	104
5.5 Valoración de la lesión cerebral a nivel molecular en los modelos de HI.....	106
5.6 Evaluación funcional. Test motores y de aprendizaje y memoria.....	108
5.7 Extracción de LCR en crías de rata y análisis de valores de PS100 β	110
5.8 Hipotermia moderada en EHI.....	115
5.9 Alopurinol en EHI.....	117
5.10 Discusión de los resultados.....	118
5.11 ¿Cuál es el futuro del tratamiento de la EHI?.....	125
6. CONCLUSIONES	128
7. BIBLIOGRAFIA	132
8. ANEXOS	163
8.1 Anexo 1. Protocolo aprobación CEEA UB.....	164
8.2 Anexo 2. Artículo publicado 1.....	165
8.3 Anexo 3. Artículo publicado 2.....	171

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Concepto y definición de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI)

Encefalopatía es un término clínico utilizado para describir un estado neuroconductual anormal caracterizado por una disminución del nivel de consciencia y que puede asociar depresión respiratoria, alteraciones en el tono y la fuerza muscular, disfunción de los pares craneales y en ocasiones convulsiones (Volpe, 2012). En el período neonatal existen múltiples causas de encefalopatía: traumática, infecciosa, genética, entre otras, pero la más frecuente es la hipóxico-isquémica (Mcintyre, 2015).

Existen múltiples definiciones del término encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). Una de ellas es la de la Academia Americana de Pediatría y el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología que definen la EHI como aquella situación clínica de hipoxia y acidosis metabólica secundaria a un insulto hipóxico-isquémico (HI) que tiene como consecuencia una interrupción en el aporte de oxígeno al feto/recién nacido produciendo una isquemia en el tejido cerebral del mismo. De esta isquemia deriva una agresión sobre el SNC que se caracteriza principalmente por una alteración en la capacidad de mantener la consciencia, el estado de vigilia y la alerta (AAP, 2004).

A nivel clínico, se considera que un recién nacido presenta una EHI cuando existe una acidosis metabólica en sangre de cordón umbilical en el momento del parto ($\text{pH} < 7.0$ y $\text{EB} > 12 \text{ mmol/l}$), un Apgar de 0 a 3 a los 5 minutos y una disfunción neurológica global, no focal, asociada o no a una disfunción multiorgánica durante las primeras 72 horas después del nacimiento (AAP, 2002).

Pero al hablar de esta entidad, es importante tener claros varios conceptos que frecuentemente se mezclan:

Se habla de Asfixia, en aquellos procesos donde existe una alteración del intercambio gaseoso que conduce, si persiste en el tiempo, a una hipoxemia e hipercapnia fetal.

La Hipoxia se define como la entrega insuficiente de oxígeno a los tejidos, que condiciona una incapacidad para alcanzar las demandas metabólicas del organismo. Esta disminución en el transporte de oxígeno puede producir secundariamente a nivel tisular, una acidosis metabólica, una disminución del gasto cardiaco (bradicardia), alteraciones del tono muscular y los reflejos, junto con una dificultad en el inicio o mantenimiento de la respiración espontánea.

Se define como Encefalopatía neonatal al síndrome clínico caracterizado por una alteración neuroconductual con disminución de la capacidad de despertar y mantener la vigilia, anomalías del tono muscular, disminución de los reflejos primitivos y con frecuencia convulsiones durante la primera semana de vida (Cloherty, 2010).

La Encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) es el cuadro clínico de encefalopatía neonatal en el que hay evidencia causal de una HI perinatal. Estos pacientes presentan una alteración en el estado de alerta y de la capacidad para despertar, del tono muscular y de las respuestas motoras y también de los reflejos pudiendo con frecuencia asociarse a convulsiones clínicas y/o eléctricas (Sham, 2006; Volpe, 2012; Ancora, 2013).

1.2 Epidemiología de la EHI. Incidencia y factores asociados

La incidencia de EHI en los países desarrollados se ha estimado de entre 3 a 5 casos por cada 1000 recién nacidos vivos, siendo los casos de EHI moderada o severa de 0.5 a 1 por cada 1000 (Martinez-Biarge, 2008). Estas cifras son muy diferentes en los países en vías de desarrollo, con una incidencia 10 veces superior. Así mismo, se cree que entre un 20-25% de los 5 millones de muertes neonatales anuales podrían ser atribuibles a la EHI (Tagin, 2015).

Entre un 15 y un 20% de los pacientes afectados de EHI grave fallecen durante el período postnatal y hasta un 25% de este grupo desarrollaran secuelas neurológicas permanentes, que incluyen trastornos del aprendizaje con déficits cognitivos,

alteraciones motoras (espasticidad, distonía y ataxia) que pueden acompañarse o no de epilepsia (Vannucci, 1997).

Alrededor del momento del parto, existen una serie de factores que predisponen o facilitan la aparición de un evento HI, y que por ello se han relacionado con la aparición de la EHI, aunque no siempre están presentes. Según el momento en el que se produce el insulto los podemos clasificar en: factores anteparto, intraparto y postparto.

Factores anteparto: En este grupo se incluyen aquellos condicionantes gestacionales que favorecen que el feto no se encuentre preparado para responder de una forma adecuada al estrés producido durante el trabajo de parto. Estos elementos pueden ser condiciones maternas pregestacionales como la diabetes, la hipertensión arterial, las enfermedades tiroideas o autoinmunes o bien complicaciones de la misma gestación como la diabetes gestacional, la preeclampsia o la restricción de crecimiento intrauterino. En un tercio de los recién nacidos afectados de EHI se ha podido identificar alguno de estos factores (Hagberg, 2002; Martínez-Biarge, 2013).

Factores intraparto: Conocidos clásicamente como los *eventos centinela*, incluyen aquellas circunstancias que implican por sí solas una situación de riesgo de HI en fetos previamente sanos. Entre ellas destacan el desprendimiento de placenta, prolapso de cordón, parto prolongado en situación transversa o una extracción dificultosa (Hankins, 2003). La monitorización fetal durante el parto permite identificar determinados patrones de riesgo (Wiberg, 2010) pero a pesar de ello, existen aún muchos eventos no predecibles con la monitorización actual.

Factores posparto: Aquellas situaciones donde se produce una persistencia de la circulación fetal que deriva en una hipoperfusión cerebral con hipoxemia. Podemos encontrar cardiopatías congénitas con bajo gasto cardíaco o situaciones de hipertensión pulmonar severa. En este grupo, también se pueden incluir los eventos que en los últimos años se han definido como colapsos post-parto (Pejovic, 2013).

Por lo tanto una situación de HI puede producirse en cualquier momento y a pesar de conocer todos los factores anteriormente mencionados hasta en un 70% de los casos de EHI neonatal no existe ninguna evidencia de un evento hipóxico (Speer, 2006).

1.3 Fisiopatología de la EHI

El daño cerebral HI es un proceso complejo que generalmente viene desencadenado por una agresión que induce una reducción en la perfusión cerebral produciendo una disminución en el aporte de oxígeno a las células del sistema nervioso central (SNC) (Douglas, 2015). La situación de HI aguda produce la muerte inmediata de algunas células (necrosis), pero la mayor parte del daño acontece en las siguientes horas, durante el período que se conoce como “fallo energético secundario”. Durante esta fase se activan numerosas cascadas bioquímicas que darán lugar a una muerte celular programada, conocida como apoptosis. La comprensión de los mecanismos que tienen lugar durante esta fase ha sido de vital importancia para el estudio de las posibles terapias “neuroprotectoras” (García-Alix, 2008). Es aquí, en el conocimiento profundo de los patrones biológicos de esta entidad, donde los modelos animales han desarrollado un papel importante.

Fases del daño hipóxico-isquémico a nivel cerebral

Para entender la fisiopatología del daño HI, en diversos estudios se ha dividido en diferentes etapas o fases, a pesar de que se solapan entre ellas.

Inicialmente y de forma inmediata tras la agresión HI, tiene lugar la despolarización de la membrana celular produciéndose un *fracaso energético primario* (caída del ATP intracelular); esta fase se conoce como *fase primaria del daño*.

La fase primaria del daño se caracteriza por una reducción en el flujo sanguíneo cerebral (FSC), disminuyendo con ello el aporte de O₂, glucosa y otros sustratos. Esta interrupción del FSC, aguda o intermitente, es el principal factor patogénico en la HI (Shalak, 2004). Este fenómeno produce una depleción de los fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina) induciendo una acidosis tisular. El fallo energético primario se asocia a la pérdida de la homeostasis iónica de la membrana celular, alterándose con ello sus funciones reguladoras como son la liberación y recaptación de aminoácidos excitatorios (glutamato). Así mismo, también se produce una osmoregulación deficiente y una inhibición de la síntesis de proteínas. La estimulación excesiva de los receptores de glutamato (NMDA) secundaria al aumento de su liberación en los terminales axonales y la pérdida de homeostasis iónica conduce a un incremento del calcio intracelular que acaba induciendo edema citotóxico (McLean, 2004; Johnston, 2011;) (Figura 1).

La severidad del daño en la fase primaria dependerá de muchos factores difíciles de controlar o prevenir como son la duración y la profundidad del insulto y/o el grado de madurez del SNC. A pesar de todo ello, también existen otros factores que pueden controlarse y contribuir a minimizar la gravedad de la lesión como son la falta de sustratos energéticos (glucosa), la temperatura, la hiperventilación y la hipotensión arterial.

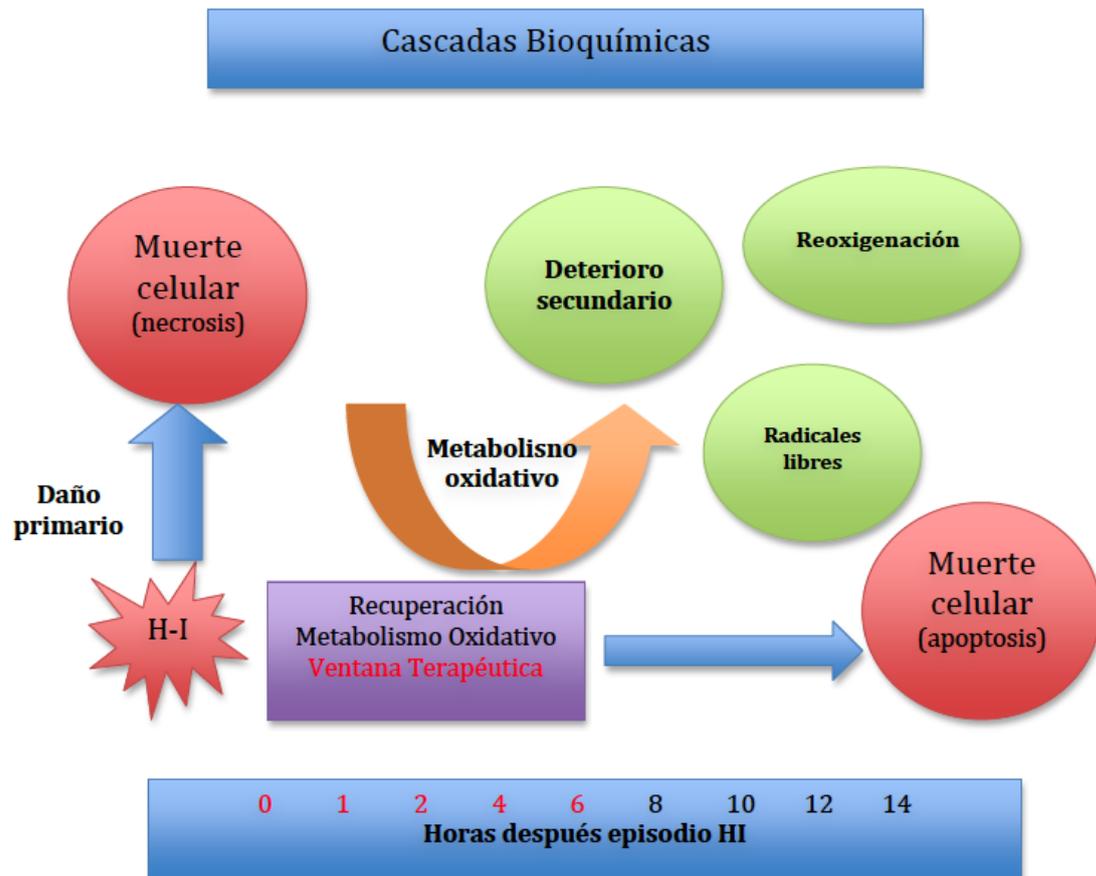


Figura 1. Fases de daño celular durante un evento HI. Se pueden diferenciar tres períodos diferentes durante el daño HI, una fase inicial, conocida como *fase primaria* donde se produce una muerte celular producida por necrosis, posteriormente hay un período de recuperación del metabolismo oxidativo coincidiendo con el restablecimiento de la circulación cerebral, llamado *período ventana*, con una duración aproximada entre 3-6 horas, y posteriormente una fase secundaria donde se inicia una muerte celular programada (por apoptosis) a consecuencia de las cascadas activadas durante la fase primaria. Acrónimos: HI: Hipoxia-isquemia.

En situación basal, el FSC se mantiene constante a pesar de los cambios en la presión arterial sistémica (autorregulación), evitando variaciones bruscas en la tensión arterial a nivel cerebral (Harper, 1966). En situaciones de hipoxia, hipo o hipercapnia o acidosis esta autorregulación se ve alterada, pasando el FSC a depender de la presión arterial pasiva (Volpe, 2008). En estos casos, la disminución en la tensión arterial sistémica producirá una disminución en el FSC que lleva en última instancia a una situación de isquemia a pesar de los mecanismos compensadores existentes que se activan para redistribuir el flujo (Mari, 2008). Este mecanismo es conocido como “brain sparing effect” y consistente en la redistribución del flujo sanguíneo hacia los órganos nobles

(cerebro, corazón, glándulas adrenales) en detrimento de otros órganos menos vitales (riñón, músculo, intestino) (Van den Broek, 2010).

Si después de esta fase se restablece la circulación y la oxigenación cerebral, se puede disminuir el grado de afectación así como la extensión de la lesión celular.

A pesar de ello, una vez restablecida la circulación cerebral tras la agresión aguda, empieza una segunda fase (habitualmente unas 6 horas después del insulto) conocida como fase secundaria del daño o *fallo energético secundario*, en la que los mecanismos de lesión celular difieren de los descritos anteriormente. Entre la fase de daño primario y la fase de fallo energético secundario existe un intervalo de tiempo conocido como *fase latente o periodo ventana*, en el que se produce una recuperación parcial de la acidosis metabólica con una normalización del pH y de las concentraciones de metabolitos del fósforo. Es durante este período, conocido como *ventana terapéutica*, donde se han ensayado la aplicación de medidas neuroprotectoras para reducir el daño cerebral que acontecerá en la fase secundaria.

A diferencia de lo que ocurre en la fase de daño primario, esta segunda fase se caracteriza por un fallo energético celular, con una disminución del ratio entre la fosfocreatina y el fosfato inorgánico, sin producirse cambios en el pH intracelular y pudiendo permanecer el paciente estable a nivel cardiorrespiratorio (Lorek ,1994). Esta depleción de fosfatos de alta energía a nivel tisular, implicará la activación de cascadas de muerte celular programada o apoptosis. La muerte por apoptosis, se caracteriza por la presencia de una contracción celular sin la presencia de una respuestas inflamatoria (Bonfoco, 1995). En esta fase del daño, contribuyen también a la lesión otros mecanismos como la acumulación de aminoácidos excitatorios, el daño producido por radicales libres y la inflamación.

1.4 Papel del daño oxidativo en la lesión cerebral por hipoxia-isquemia

Después de la recuperación de un evento HI, se produce la reperusión tisular gracias a la restauración del flujo sanguíneo. El daño celular dependerá directamente del tiempo y de la intensidad de la HI, así como de la concentración de oxígeno utilizada

durante la reperfusión (Granger, 2015). Durante la reperfusión, el oxígeno será utilizado por los enzimas pro-oxidantes y la mitocondria para crear radicales libres o los llamados productos oxidantes (Rosenberg, 1989; Maulik, 1998). En condiciones normales estos oxidantes se encuentran en el organismo en bajas concentraciones y son utilizados, entre otras reacciones enzimáticas, para regular el tono vascular, monitorizar la tensión de oxígeno y controlar la producción de eritropoyetina. Durante una situación de isquemia, a pesar de que se produce un aumento de la expresión de estos enzimas antioxidantes (Fukui, 2002), su capacidad tamponadora se ve superada por la liberación masiva de radicales libres (Rosenberg, 1989; Fridovich, 1995; Warner, 2004), que en concentraciones elevadas oxidan de manera irreversible macromoléculas como el DNA, los lípidos y las proteínas dañando de forma permanente la célula (Ratan, 1994).

Estos radicales libres pueden también ser producidos en los procesos activados por el Ca^{2+} y/o a partir de la síntesis de las prostaglandinas originadas de la descomposición de los ácidos grasos libres durante el daño primario. A pesar de todo, 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 como la HI se produce un incremento en la formación de radicales libres que pueden desestructurar la mitocondrias y bloquear la generación de energía (Kroemer, 1997; Lievre, 2000). A todo ello debemos sumar la presencia de metales de transición en el SNC como el hierro, que incrementará los procesos oxidativos (Nuñez, 2017). El desequilibrio entre la formación de radicales libres y su neutralización generará lo que se conoce como estrés oxidativo.

Otras fuentes productora de radicales libres son algunos enzimas como la xantina oxidasa y la NADPH (Nicotinada Adenina Dinucleótido Fosfato) Oxidasa (Saugstad, 1996; Warner, 2004; Ono, 2009).

La xantina-oxido-reductasa es un enzima clave en el catabolismo de las purinas, al hidroxilar entre otros la xantina a ácido úrico. Tiene 2 formas intercambiables: la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa siendo la xantina deshidrogenasa su forma predominante en los tejidos sanos (Robert, 2014). La xantina deshidrogenasa usa el NAD^+ como receptor de electrones, mientras que la xantina oxidasa usa el O_2 como el electrón receptor teniendo la capacidad de generar radicales libres (Figura 2).

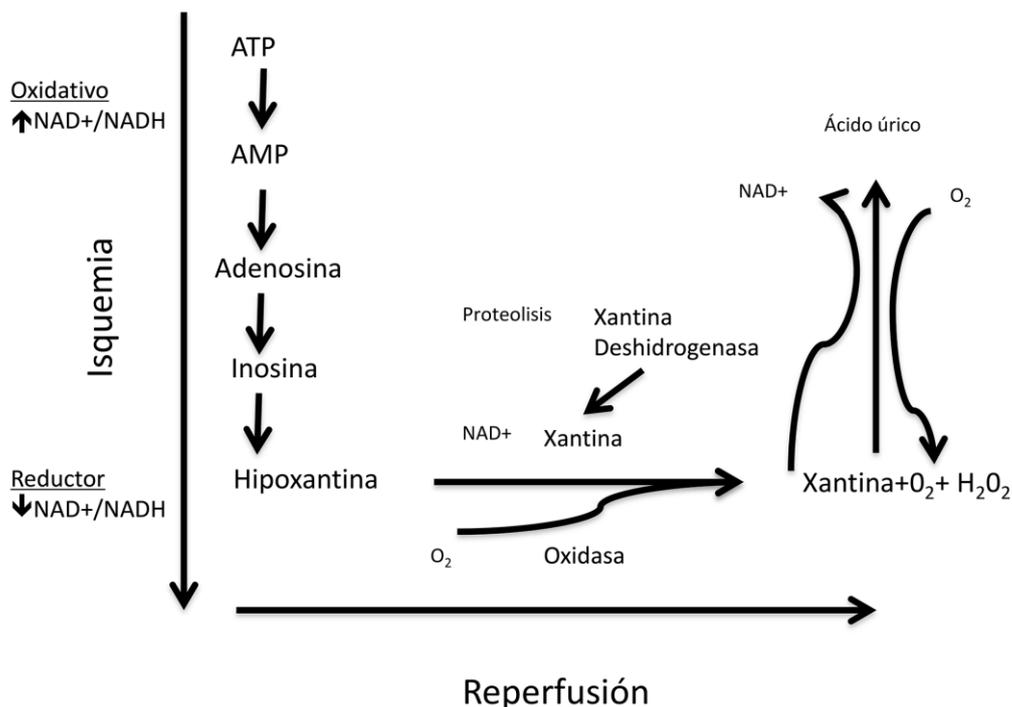


Figura 2. Mecanismos de generación de radicales libres por parte de la xantin-oxido-reductasa en los tejidos expuestos a una isquemia y reperfusión. Durante la isquemia, el ATP es catabolizado a hipoxantina y la forma deshidrogenada de la xantina-oxido-reductasa, a través de la proteólisis en la xantina oxidasa. Una vez acontece la reperfusión, el O_2 interactúa con la hipoxantina del tejido, la xantina oxidasa genera superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que pueden interactuar generando una mayor cantidad de radicales libres. Durante la isquemia, el estado reductor del tejido se encuentra alterado de un estado oxidativo a un reductor. Acrónimos : NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido. NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenasa. AMP: Adenosín monofosfato

En situación basal, el metabolismo del ATP lleva a una acumulación de hipoxantina, en esta situación la xantina oxidasa se encuentra unida a la hidrogenasa y reducida en forma de xantina deshidrogenasa. Sin embargo, en situación de isquemia tisular, se produce una entrada de Ca^{2+} intracelular que estimula la escisión irreversible de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. Esta activación de la xantina oxidasa, localizada fundamentalmente en las células endoteliales, metaboliza la hipoxantina a xantina generando radicales libres como son el superóxido y el peróxido de hidrógeno originando la denominada vasoparálisis postasfíctica, que aumenta entre otros la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y contribuye a la formación del edema vasogénico (Parks, 1986; Granger, 2015).

Secundariamente también a la entrada de Ca^{2+} en las neuronas, se produce una activación de los receptores de glutamato, activándose la óxido nítrico sintetasa neuronal (ONS) que dará lugar a la formación de óxido nítrico (ON). El ON tiene un efecto dual sobre la peroxidación lipídica, por una parte reacciona con el superóxido (O_2^-) dando lugar a peroxinitrito iniciándose la peroxidación lipídica, pero por otro lado la inhibe captando radicales intermedios como el alkoxil y peroxil-

El ON inhibe la cadena respiratoria mitocondrial bloqueando de forma reversible la citocromo oxidasa de la mitocondria, este bloqueo cambia la cadena de transporte de electrones a un estado más reducido favoreciendo también a la producción de radicales O_2^- (Perlman, 2007). Así tanto el ON como los peroxilos lípidicos actúan como radicales libres, generando una reacción en cadena que lleva al daño de estructuras celulares. Todo ello contribuye a la liberación por parte de la mitocondria de proteínas pro-apoptóticas que inducen a través de la vía de las caspasas o del factor de inducción de apoptosis (AIF) la muerte celular (Johnston, 2011; Liu, 2015).

En condiciones basales los enzimas antioxidantes tanto enzimáticos como las superóxido dismutasas, como los no enzimáticos como la transferrina o vitamina que bloquean la peroxidación lipídica (A,E,C) son capaces de tamponar la liberación de radicales libres, pero si las concentraciones de radicales libres y de calcio intracelular sobrepasan la capacidad neutralizadora y homeostática de la mitocondria, se produce una desintegración de la membrana a través de la apertura de un canal conocido como poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). La apertura del mPTP es uno de los principales mecanismos de necrosis y apoptosis de las células tras la isquemia y reperfusión cerebral (Blomgren, 2006; Ten, 2012).

El sistema nervioso central es deficitario en defensas oxidativas, siendo aun más susceptible al daño oxidativo el cerebro inmaduro dado que los mecanismos para contrarrestar la formación de radicales libres no están completamente desarrollados y además tiene la particularidad de que posee una elevada disponibilidad de hierro, factor favorecedor de su formación (Drury, 2014).

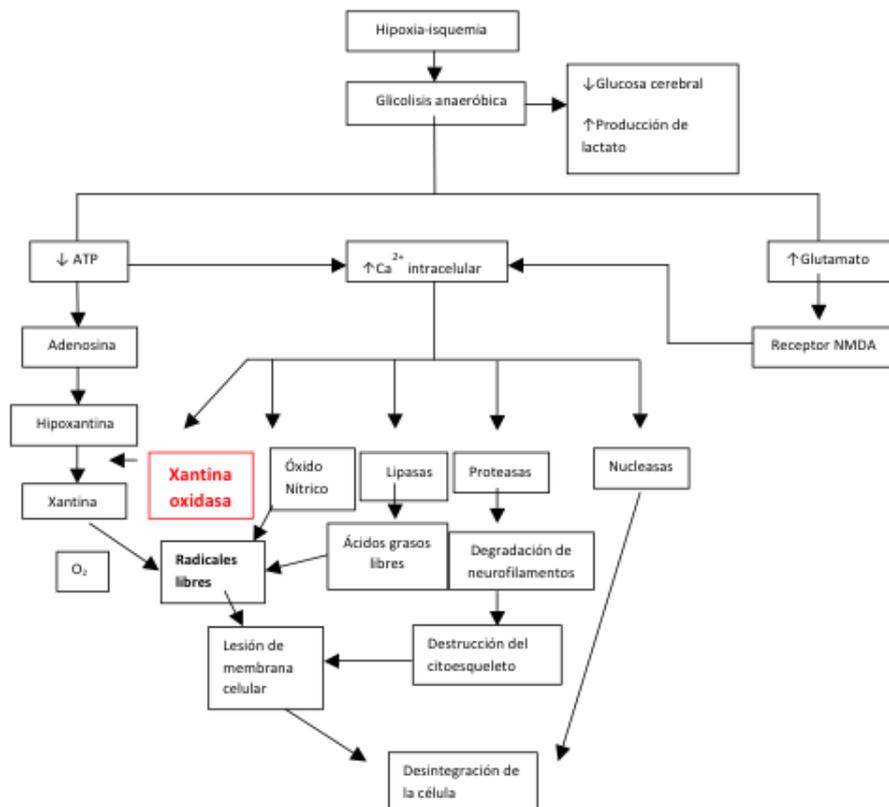


Figura 3 . Diferentes vías moleculares que conducen al daño celular durante un evento HI. En el esquema se puede ver las múltiples cascadas que se activan después de un evento hipóxico-isquémico. Todas ellas acaban conduciendo a la destrucción celular. Acrónimos: NMDA : N-metil-D-aspartato.

Es esencial por lo tanto la búsqueda de terapias antioxidantes en el tratamiento de la EHI, que puedan actuar sobre el daño celular secundario al stress oxidativo inhibiendo la formación de radicales libres o bien taponándolos una vez formados. La eficacia de estos tratamientos será máxima cuantos antes se administren, dado que su liberación alcanza su pico a los 30 minutos después del evento HI (McCord JM, 1985).

1.5 Modelos animales de EHI

A lo largo del siglo pasado han sido diversos los modelos animales utilizados para el estudio y conocimiento de la fisiopatología de las lesiones que tiene lugar en los pacientes que sufren una EHI en el periodo neonatal. La especie más utilizada han sido los roedores (Levine, 1960), seguidos por las de crías de cerdo (Leblanc 1991) y las ovejas (Mallard, 1993; Roohey, 1997).

En roedores uno de los modelos más ampliamente utilizados en la literatura es el de crías de rata descrito por Ricce-Vannucci (Vannucci, 2005). Este modelo es una evolución del modelo de daño cerebral publicado por Levine en 1960 (Levine, 1960). En él se procede a clampar unilateralmente una de las dos carótidas y después de la cirugía los animales se someten a un ambiente hipóxico (8-12% O₂) con óxido nitroso durante un período de tiempo variable (90-150 minutos) mientras se mantienen en un ambiente termoestable (temperatura constante de 37 °C) (Vannucci, 1981; Vannucci, 2005).

Con esta metodología se reproduce una lesión unilateral que incluye los ganglios de la base, el hipocampo y parte del córtex.

1.6. Hipotermia moderada o sostenida terapéutica como tratamiento en la EHI

1.6.1 Historia de un tratamiento: hipotermia moderada

A pesar de los grandes avances en perinatología, como la mejoría en el control gestacional y el aumento de la monitorización fetal, desde la década de los 80 hasta del siglo XX la incidencia de EHI no ha disminuido en los países occidentales (Perlman, 1997). Tampoco durante todo este tiempo, se disponía de ninguna terapia específica para reducir el daño cerebral que se sufrían muchos de estos niños. Recibiendo solo

tratamiento con medidas de soporte vital y con el manejo de las crisis comiciales (Whitelaw, 2002).

Desde mediados de los años 90 existe suficiente evidencia científica sobre la eficacia y seguridad de la *hipotermia moderada* como tratamiento para minimizar el daño hipóxico-isquémico en modelos animales de EHI (Gunn, 1998). En la siguiente tabla se pueden encontrar los principales trabajos publicados sobre los efectos neuroprotectores de la hipotermia en modelos animales (Tabla 1).

Autor	Animal	Resultados
Berntman L, 1981	Rata	Disminución concentraciones cerebrales ATP, PCr, lactato en las ratas hipotérmicas (34 °C).
Young RS, 1986	Rata	Mejoría en los test motores pero no en los test de aprendizaje en las ratas que se sometieron a HI a 21 °C comparadas con las de 37°C.
Ikonomidou C, 1989	Rata	Hipotermia moderada asociada a MK-801 (antagonista receptor NMDA) ofrece una protección total contra el daño HI.
Yager J, 1993	Rata	Disminución de la extensión del daño histológico en crías de rata tratadas con hipotermia moderada (31°C o 34 °C).
Thoresen M, 1995	Cerdo	Niveles más altos de Pcr/Pi y NTP/EPP en los animales tratados con hipotermia moderada 35 °C.
Gunn AJ, 1997	Cordero	Mejoría en el EEG y disminución de la extensión del daño histológico en los animales del grupo hipotermia.

Tabla 1. Resumen de algunos de los primeros trabajos sobre los efectos de la hipotermia en modelos animales de EHI . Acrónimos tabla: ATP: Adenosín trifosfato. PCr: Fosfocreatina. NMDA: N-Metil-D-aspartato. HI : Hipóxico-isquémico Pi: Fósforo inorgánico NTP: Nucleótido trifosfato (Nucleotide triphosphate). EPP: Cantidad de fosfato intercambiable (exchangeable phosphate pool). EEG: Electroencefalograma.

A pesar de ello, el miedo a los posibles efectos secundarios de la hipotermia en el recién nacido dificultaba su implementación como tratamiento en las unidades neonatales (Bower, 1960). Clásicamente, la hipotermia en el recién nacido, se había relacionado con alteraciones en la síntesis de surfactante, disminución en la perfusión

pulmonar, alteraciones en la contractibilidad cardíaca, en la homeostasis, en el sangrado, en la inmunidad o en las funciones gastrointestinales (Schubert, 1995).

A finales de 2005, dos ensayos clínicos multicéntricos randomizados (Gluckman, 2005; Shankaran, 2005) junto con los resultados de otros dos trabajos (Battin, 2001; Inder, 2004) consiguieron reunir la evidencia suficiente para demostrar que la hipotermia moderada terapéutica era una estrategia terapéutica para disminuir el daño cerebral asociado a la EHI, y que las posibles complicaciones derivadas de su utilización eran mínimas siendo parecidas a las que presentaban los individuos del grupo control. Estos trabajos fueron una revolución para la neonatología moderna, demostrando que la hipotermia terapéutica moderada sostenida reducía la mortalidad y la discapacidad severa en 1 de cada 6-8 niños tratados (Azzopardi, 2014). Uno de los principales miedos a implementar dicho tratamiento era el de que condujera a un aumento de los pacientes con discapacidad severa, como consecuencia de una mayor supervivencia en pacientes que anteriormente tal vez habrían fallecido. Esta hipótesis no se confirmó en posteriores metaanálisis donde se evidenció que la disminución de la mortalidad no implicaba un incremento en la supervivencia de pacientes con discapacidad severa (Jacobs 2007; Shah, 2007).

Actualmente, la hipotermia es el único tratamiento probado y eficaz en el manejo de los recién nacidos afectados de EHI significativa (moderada o grave). A pesar de ello, los efectos protectores de la hipotermia son incompletos y la morbimortalidad de estos pacientes sigue siendo alta (Shah, 2010; Dingley, 2014). Es por ello que las nuevas líneas de investigación van orientadas a la búsqueda de tratamientos coadyuvantes que potencien los efectos neuroprotectores de la hipotermia y ayuden a mejorar el pronóstico neurológico de estos niños (Fan, 2010; Cilio, 2010).

1.6.2 Hipotermia y modelos animales

Las primeras evidencias de que la hipotermia moderada podría funcionar como neuroprotección después de un evento HI aparecieron en trabajos realizados en modelos animales a finales de la década de los 80 y a principios de los 90.

Uno de los primeros trabajos fue el de Berntman y colaboradores (Berntman, 1981), en el se demostró que las ratas tratadas con hipotermia (34 C°) durante de un evento HI (modelo de Rice-Vannucci de daño cerebral) presentaban una menor afectación neuronal que los del grupo de normotermia (36 C° o 37 C°). Su hipótesis se fundamentaba en el efecto beneficioso descrito previamente en los pacientes sometidos a bypass cardíaco y hipotermia (Rittenhouse, 1974) o con lesiones cerebrales postraumáticas y hipotermia (Strong, 1967).

Posteriormente se publicaron los primeros trabajos sobre la hipotermia como tratamiento en crías sometidas a un evento HI (Young, 1986). En estos estudios, los supervivientes del grupo hipotermia presentaban menos secuelas motoras y de aprendizaje. Todos estos trabajos aplicaban la hipotermia durante el evento HI. A mediados de los años 90 *Trescher y colaboradores* demostraron que la hipotermia post-evento HI también disminuía las lesiones cerebrales en crías de rata de 7 días. Los animales tratados con hipotermia presentaban menor extensión del daño cerebral tanto a nivel histológico como a nivel macroscópico (Trescher, 1997).

Gracias a la evolución de la investigación en los modelos animales se evidenció que una de las claves de la eficacia de la hipotermia como estrategia neuroprotectora era el momento de su inicio. Si se aplicaba de forma precoz, durante la fase latente y previo al inicio de la fase secundaria del daño, mejoraban los resultados obtenidos. En crías de cordero la hipotermia iniciada a los 90 minutos post-evento hipóxico y prolongada durante 72 horas evitaba el edema citotóxico y mejoraba el trazado del EEG (Gunn, 1997). Este efecto neuroprotector se mantenía incluso si el tratamiento se demoraba hasta las 5 horas post HI (Gunn, 1998). Pero los mismos autores presentaron un trabajo en crías de cerdos dónde se evidenciaba que los animales que recibían

tratamiento una vez iniciadas las crisis comiciales (8 horas después de la reperfusión, fase secundaria) no presentaban mejoría (Gunn, 1999). En crías de cerdo, la prolongación del tratamiento, durante 12 – 24 horas, selectivamente en la cabeza o a nivel de todo el cuerpo, se demostró eficaz en la prevención del fallo energético tardío (Thoresen,1995), las convulsiones (Tooley,2003) y la pérdida neuronal (Edwards, 1995). En la tabla 2 se resume los principales trabajos con hipotermia en roedores, describiendo el momento de inicio, la duración y el grado de la misma.

Autor	Edad ratas	Grado de lesión HI	Grado de HT/Daño	Evaluación histológica	Resultado
Thoresen,, 1996	7 días	120 minutos, 8% O2 a 36.5 °C	32.5 °C durante 3 h 38.5 °C durante 8 h	Evaluación córtex, tálamo, ganglios de la base y hipocampo	Menor afectación histológica en hipocampo en HT vs NT (p=0.04) y en el resto de áreas sobretodo en el córtex (p=0.001)
Trescher, 1997	7 días	75 minutos, 8% O2 a 36.5 °C	32 °C durante 3 h 33 °C durante 3 h 38°C durante 3 h	Evaluación córtex cerebral posterior, nucleo anterior estriado y parte dorsal hipocampo	Menor afectación histológica en HT vs NT (p=0.046)
Bona, 1998	7 días	70 minutos 8% O2 a 37 °C	32 °C durante 6 h 37 °C durante 6 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en HT (34%) vs NT (53%)
Zhu, 2004	7 días	60 minutos, 8% O2 a 36.5 °C	30 °C durante 3 h 36 °C durante 8 h	Evaluación córtex, hipocampo y tálamo	Menor afectación histológica en HT (40%) vs NT (80%)
Lee, 2010	7 días	150 minutos, 8% O2 a 36 °C	30 °C durante 24/48 h 33 °C durante 24/48 h 36°C durante 24 h	Evaluación de daño hemisférico global	Mayor volumen cerebral en las ratas HT (57.11%) vs NT (40.2%). No diferencias entre los diferentes grupos HT.
Fan, 2012	7 días	90 minutos, 8% O2 a 37 °C	32.5 °C durante 3 h 37 °C durante 3 h	Evaluación de daño hemisférico global y hipocampo	Menor afectación en hembras HT (55%) vs NT(75%) pero no en machos HT
Sabir, 2012	7 días	90 minutos 8% O2 a 37 °C	32.5 °C durante 5 h 37 °C durante 5 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en HT (24.8%) vs NT (39%)
Sabir, 2012	7 días	150 minutos 8% O2 a 37 °C	32.5 °C durante 5 h 37 °C durante 5 h	Evaluación de daño hemisférico global	No diferencia de afectación en HT (56.8%)vs NT (57%)
Fang, 2013	7 días	120 minutos, 8% O2 a 37 °C	32 °C durante 8 h 37 °C durante 8 h	Evaluación de córtex parietal, putamen, hipocampo, tálamo	No diferencias estadísticamente significativas
Patel, 2015	10 días	60 minutos 8% O2 a 36.5 °C	32 °C durante 4 h 37 °C durante 4 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en neocortex y tálamo pero no en hipocampo en los animales con daño moderado-grave grupo HT vs NT (p<0.05). No diferencias en animales con daño leve

Tabla 2. Tabla que muestra los principales estudios realizados en crías de rata según modelo Rice-Vanuucci para evaluar tratamiento con hipotermia y valoración en la histología publicados hasta la fecha Acrónimos tabla. H:horas HT: Hipotermia. NT:Normotemia.

1.6.3 Mecanismos neuroprotectores de la hipotermia

El tratamiento con hipotermia debe iniciarse durante el período ventana existente entre la fase primaria y la fase secundaria, una vez ha sido restaurado el metabolismo cerebral y debería mantenerse hasta la resolución de la fase secundaria (Roelfsema, 2004). Por otro lado si el tratamiento es instaurado una vez la fase secundaria ha sido iniciada, disminuye de forma substancial los posibles beneficios que pueda conferir la hipotermia, dado que la mayoría de células ya se encuentran en una fase irreversible de muerte celular programada (Gunn, 2007).

Existen diferentes trabajos que demuestran que en el recién nacido este momento es antes de las 6 horas post-evento hipóxico y preferiblemente antes de las 3 horas. (Shankaran, 2005; Shankaran, 2017).

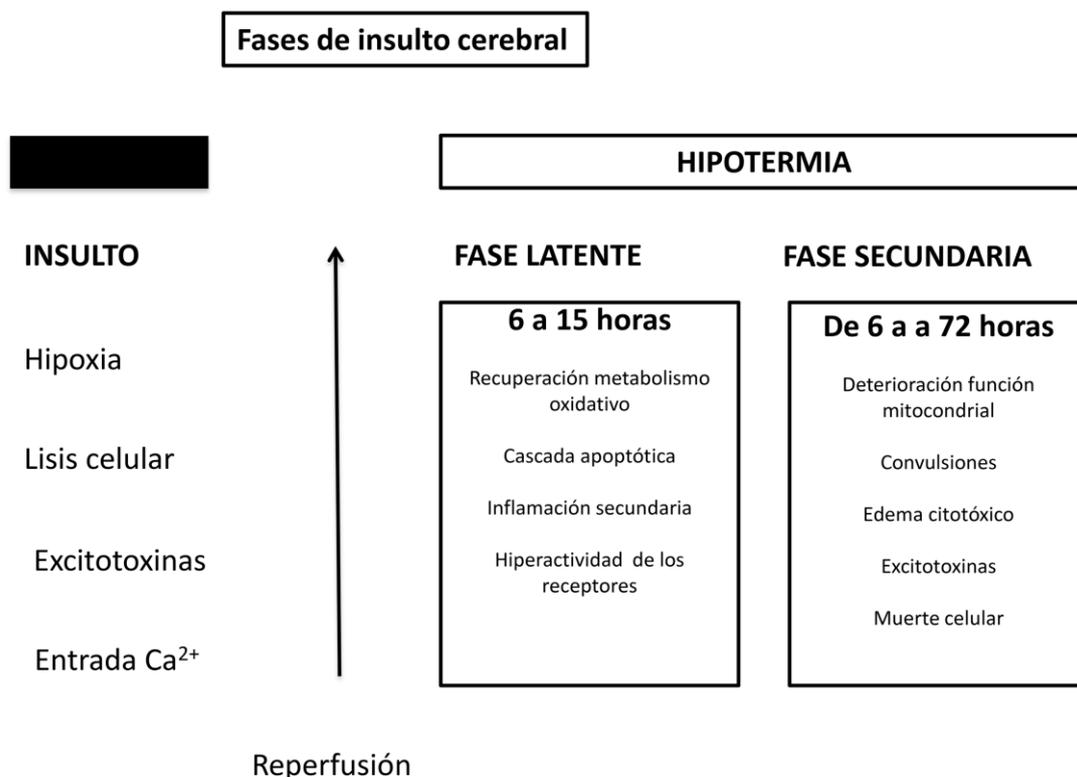


Figura 4. Esquema sobre el momento ideal de aplicación de la hipotermia.

Tal y como hemos descrito, el daño cerebral que acontece en un paciente con EHI es un proceso evolutivo. Durante la fase aguda, inmediatamente después de un evento HI se produce la necrosis de algunas neuronas (daño primario) (Gunn, 2006), en la horas siguientes, algunas neuronas se recuperan parcialmente (a fase latente), aunque no todas lo consiguen y muchas de ellas acaban muriendo en las siguientes horas o días por apoptosis (daño secundario) (Figura 1). Los mecanismos por los que se produce el daño cerebral son muchos y diversos por lo que tratamientos como la hipotermia, también pueden tener diferentes dianas terapéuticas. Al reducir el metabolismo cerebral, se demora el inicio de la despolarización celular así como las necesidades energéticas (Laaptok, 1995). También disminuye la liberación y acumulación de aminoácidos excitatorios (Nakashima, 1996) y suprime la formación de superóxido y ON (Thoresen, 1997).

Durante la reperfusión, se liberan grandes cantidades de radicales libres que cruzan la barrera hematoencefálica penetrando al SNC. La hipotermia actúa durante esta fase acortando el período necesario para esta recuperación (Thoresen, 1997) pero no actúa tamponando estos radicales libres. Así mismo, la hipotermia es capaz de inhibir la activación de los genes que participan en la cascada involucrada en la homeostasis del calcio, la integridad sináptica y la inflamación (Nagel, 2012). También actúa sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Gong, 2013) reduce la activación de las caspasas implicadas en la activación de la apoptosis. Todas estas dianas han sido confirmadas en modelos *in vitro* (Xu, 2002).

Otro de los mecanismos que aumentan el daño cerebral durante la fase secundaria es la inflamación producida por la liberación de citoquinas y interleuquinas que actúan lesionando las células por neurotoxicidad, exacerbando también la apoptosis (Blomgren, 2006). La hipotermia disminuye la liberación de estos mediadores inflamatorios tanto *in vitro* (Si, 1997) como *in vivo* (Meybohm, 2010) (Figura 5).

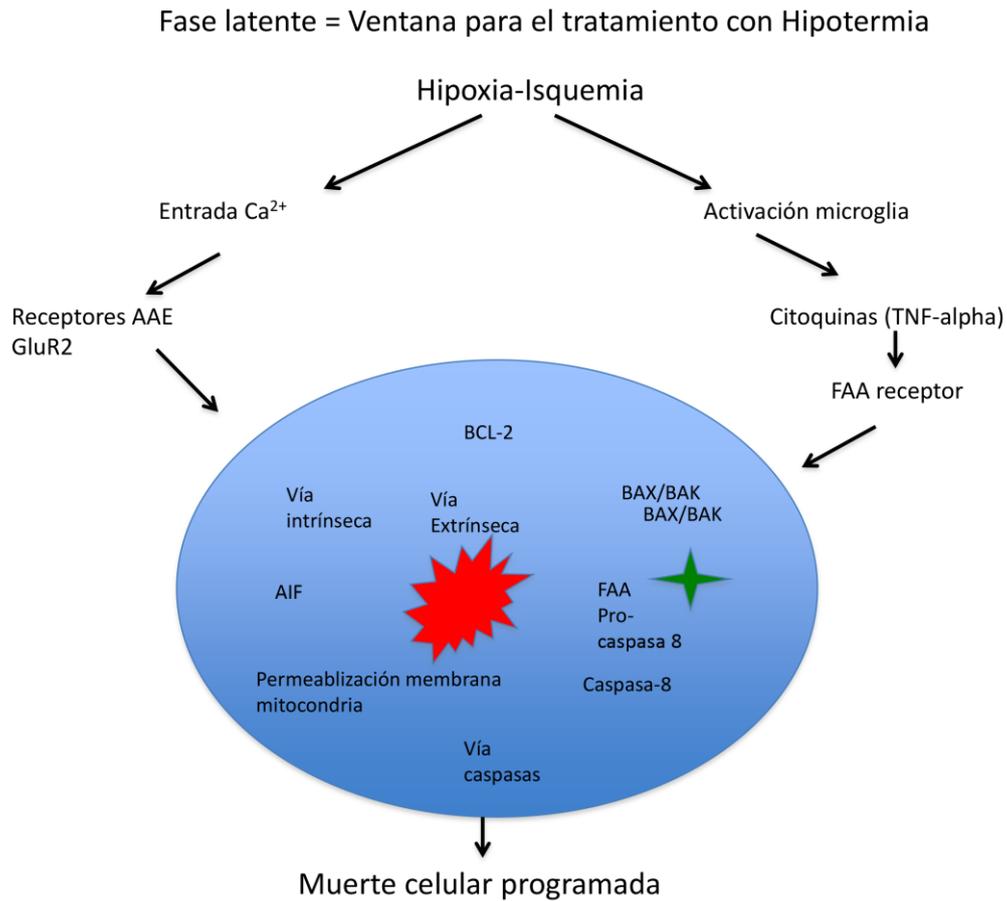


Figura 5. Esquema que ilustra los potenciales puntos clave terapéuticos de la hipotermia durante la fase de latencia de recuperación después de la HI. Acrónimos: AIF: Factor inductor apoptótico, BAK: Bcl-2 antagonista killer, BAX: Bcl-2 proteína asociada al X, BCL-2: Célula B tipo linfoma 2 de la familia de las proteínas, EEA: Aminoácido excitatorio, FAA: Proteína grasa asociada con dominio de muerte, GluR2: Receptor de ácidos del subtipo impermeable del calcio del α -amino-3-hidroxi-5metil-4isoxazolepropionico, TNF- α : Factor necrótico tumoral- α .

También se ha descrito el efecto beneficioso de la hipotermia sobre las crisis comiciales, muchas veces difíciles de controlar en los neonatos afectados de EHI (Srinivasakumar, 2015). La hipotermia disminuye la intensidad y la duración de las convulsiones (Srinivasakumar, 2013) disminuyendo el consumo metabólico y previniendo la afectación de zonas menos lesionadas (Gunn, 1996).

1.6.4 Duración tratamiento con hipotermia

Existe suficiente evidencia que demuestra que una vez iniciado el tratamiento con hipotermia es necesario mantenerlo durante 48 horas para conseguir una neuroprotección óptima (Gunn, 2006). Recientemente se demostró que no existía ningún beneficio en alargar el tratamiento hasta las 120 horas (Shankaran, 2014). La mayoría de trabajos sugieren que la duración del tratamiento en los recién nacidos afectados de EHI debería ser de 72 horas (Jacobs, 2013).

Así mismo, es también esencial, el momento en el que se inicia, siendo necesario su inicio antes del fallo energético secundario, como muy tarde 6 horas después del mismo aunque cuanto antes mayor eficacia (Shankaran, 2017).

Los principales ensayos clínicos en recién nacidos afectados por EHI sugieren que existe suficiente evidencia para afirmar que el tratamiento con hipotermia moderada sostenida (temperatura central entre 33-33.5°C) es efectiva en la disminución de la mortalidad y de la discapacidad severa en aquellos pacientes que inician el tratamiento antes de las 6 horas de vida. La evidencia actual recomienda iniciar el tratamiento durante las primeras 6 horas y mantenerlo durante 72 horas. Con ello se ha visto que el número de pacientes necesarios a tratar (NNT) para evitar un caso de muerte o discapacidad severa a los 18 meses de 6-9 (Shankaran,2005; Gluckman,2005; Eicher, 2005).

Por todo ello tal y como se ha descrito previamente, el tratamiento con hipotermia ha supuesto un importante avance en el manejo de una entidad para la que no se conocían otros tratamientos a parte de las medidas de soporte. A pesar de ello, el NNT aún es muy bajo, por lo que son necesarias nuevas vías de investigación que permitan investigar nuevas terapias que asociadas a la hipotermia minimicen el daño en estos pacientes y nos ayuden a mejorar su pronóstico.

1.7 Otras estrategias neuroprotectoras

En la actualidad existen otros fármacos que se están utilizando a nivel experimental para el tratamiento de la EHI. Algunos de ellos ya se han estudiado su efecto de forma coadyuvante al tratamiento con hipotermia.

Cannabinoides

Los cannabinoides junto con sus receptores pertenecen a un sistema natural del cuerpo humano integrado dentro del SNC: el sistema cannabinoide endógeno. Este sistema participa en múltiples procesos fisiológicos en los mamíferos y puede activar vías de señalización anti-apóptica, inhibiendo la entrada de Calcio, o realizando diversos efectos antioxidantes después de un evento HI como han demostrado varios estudios en modelos animales (Castillo, 2010; Pazos, 2012).

También se ha evidenciado su eficacia en situaciones de isquemia cerebral preservando la circulación cerebral (Alvarez, 2008).

A largo plazo, han demostrado acelerar la recuperación de la sustancia blanca dañada después de un evento HI, aumentando la proliferación de progenitores de oligodendrocitos, su maduración y supervivencia (Fernandez, 2010).

No solo eso, si no que un estudio reciente ha demostrado que la combinación de la hipotermia moderada junto con el tratamiento cannabinoide disminuye la inflamación, el estrés oxidativo y la cascada de daño oxidativo en un modelo HI en crías de cerdo (Lafuente, 2016).

Xenon

El xenon es un gas elemental inerte, 4 veces más pesado que el aire del que no se han demostrado efectos adversos o tóxicos para el humano (Rossaint, 2003). Tiene la propiedad de ser eliminado a través de los pulmones al poco de interrumpir su administración por lo que su efecto es fácilmente reversible. Uno de sus principales inconvenientes es su elevado precio.

Existen numerosos estudios tanto en modelos animales (Ma D, 2005; Dingley, 2006; Hobbs, 2008) que han demostrado su eficacia neuroprotectora bien de forma aislada o bien

asociado a la hipotermia. Algunos de ellos han evidenciado a nivel histológico que el xenon inhalado (50%) potencia de forma sustancial el efecto neuroprotector de la hipotermia (Chakkarapani, 2010).

En el estudio de Azzopardi (Azzopardi, 2016) a pesar de lo que podía anticiparse en los estudios comentados en modelos animales, no se detectaron diferencias en los desenlaces primarios o secundarios establecidos. Aunque el estudio mostró la factibilidad y la seguridad del xenon, lo realmente importante es que no demostró un efecto sinérgico con la hipotermia terapéutica.

En la actualidad hay un estudio randomizado que se encuentra en Fase II donde se valora la combinación de la hipotermia con xenon al 50%.

Eritropoyetina (EPO)

La EPO es una glicoproteína con propiedades pleiotrópicas. Su principal mecanismo de acción y por el que es más conocida es por su papel inductor en la eritropoyesis, pero tiene muchas otras propiedades como su capacidad para inducir angiogenesis y neurogenesis, potencial para modular la respuesta inmune y efectos sobre la inhibición de la muerte celular (Xiong, 2011). También tiene propiedades antiexcitotóxicas, antioxidativas y antiapoptóticas (Villa, 2003).

La EPO y su receptor (EpoR) se encuentran expresados en muchos tejidos, entre ellos el SNC en desarrollo (Yu, 2002). Cuando hay un evento HI agudo, se produce un incremento de la expresión del EpoR en los oligodendrocitos y neuronas a pesar de no incrementarse contra los niveles de EPO circulante (Mazur, 2010). La presencia en la superficie celular de EpoR libre conduce a las neuronas y oligodendrocitos a la apoptosis, mientras que la unión de EPO con EpoR las protege de la muerte celular programada (Juul, 2004; Xenocostas, 2005).

La EPO ha demostrado reducir el tamaño de las lesiones cerebrales en modelos animales de EHI (Fan, 2011) y mejora los resultados neuromotores en humanos (Zhu, 2009). Los efectos de la EPO son dosis dependientes, así presenta una mayor eficacia el uso de múltiples dosis comparado con el de una simple dosis (Statler, 2007).

Existen modelos animales evaluando la combinación de hipotermia con EPO pero sus resultados son dispares, mostrando solo una leve mejoría los grupos tratados con terapia dual respecto a los tratados con monoterapia, siendo además este beneficio solo presente en los animales de sexo femenino, concordando con otros trabajos que han demostrado un mayor neuroprotector de la hipotermia, en los animales de sexo femenino (Fan, 2013; Fang, 2013).

En recién nacidos humanos afectados con EHI se han realizado diversos ensayos clínicos evaluando la eficacia de la EPO como monoterapia (Elmahdy, 2010) y asociado a la hipotermia (Rogers, 2014; Wu, 2016). Actualmente existen dos ensayos clínicos: “Neonatal Erythropoietin And Therapeutic Hypothermia Outcomes in Newborn Brain Injury” (NCT01913340) y el “Efficacy of Erythropoietin to Improve Survival and Neurological Outcome in Hypoxic Ischemic Encephalopathy (NCT01913340) que servirán para valorar el papel que tendrá la utilización de eritropoyetina en el tratamiento futuro de la EHI.

Topiramato

El topiramato es un agente anticonvulsivante que tiene múltiples mecanismos de acción (Shank, 2000; Guerrini, 2006): inhibe los receptores de glutamato (Angehagen, 2005), bloquea de los canales de Na^+ (Zona, 1997) y de calcio (Costa, 2006) e inhibe la permeabilidad de la mitocondria (Kudin, 2004). Ya ha sido utilizado en la clínica como anticonvulsivante en adultos y niños, demostrándose su buena absorción, su alta biodisponibilidad y su buena tolerancia (Guerrini, 2006). Todos ello lo configura a nivel teórico como un buen agente neuroprotector.

A nivel experimental, su eficacia frente el daño cerebral HI ha sido probada en diferentes modelos tanto *in vitro* (Noh, 2006) como *in vivo* (Schubert, 2005), demostrándose su capacidad para reducir la severidad del daño cerebral (Liu, 2005).

En recién nacidos afectados de EHI existe un estudio piloto que ha probado la seguridad de la utilización del topiramato como tratamiento coadyuvante a la hipotermia. El principal problema del estudio ha sido el reducido número de la muestra (Fillipi, 2010). En estos momentos, se están realizando dos ensayos clínicos multicéntricos

randomizados para evaluar la eficacia de la hipotermia junto con el topiramato llamados “Neonates Receiving Whole Body Cooling for Hypoxic Ischemic Encephalopathy” (NCT01765218) (Fillipi, 2012) y HYPOTOP (PI14/O443) (Vento, 2014).

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina (neurotransmisor) endógeno. Tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios y propiedades anti-apoptóticas (Alonso-Alconada, 2013). Es capaz de pasar la placenta y la barrera hematoencefálica. En modelos animales de asfixia ha demostrado su eficacia en monoterapia (Carloni, 2008) o coadyuvante a la hipotermia (Robertson, 2013). Recientemente, un ensayo clínico en recién nacidos afectados de EHI ha demostrado que su administración endovenosa asociado a la hipotermia reduce el metabolismo oxidativo y mejorar la supervivencia con un mejor desarrollo neuromotor a los 6 meses de vida (Ali, 2015).

Terapia con células madre

La terapia con células madre es una novedosa y prometedora línea de investigación. Algunos trabajos sobre neuroprotección y neuroregeneración en adultos con infarto, han presentado resultados muy esperanzadores (Diamandis, 2015).

En recién nacidos existe la ventaja de poder obtener estas células directamente del cordón umbilical dado la gran cantidad de células madre presentes en el mismo. El trasplante autólogo en las horas posteriores al parto tendría la ventaja de la mínima manipulación *ex vivo*, sin necesidad de inmunosupresión posterior. El principal problema radica en aquellos casos en que ocurra un desprendimiento de placenta, ruptura uterina u otro evento adverso grave donde no se podrían recoger las células del cordón (Liao, 2013).

Los estudios realizados hasta el momento con neonatos afectados de otras enfermedades del SNC han mostrado resultados prometedores (Escolar, 2005). Actualmente existe un ensayo clínico en fase 1 que ha evaluando la terapia mediante trasplante autólogo de células madre de sangre de cordón umbilical conjuntamente

con hipotermia (NCT00593242) (Cotten, 2014). Este ensayo clínico de factibilidad ha demostrado resultados prometedores.

Aún así hace falta más estudios para poder desarrollar la mejor estrategia para saber la cantidad necesaria de células, el momento del trasplante, la vía de administración de las mismas y también refinar los métodos para disminuir el tiempo mínimo para procesar las células madre (Liao, 2013).

1.8 Alopurinol

El alopurinol es un isómero de la hipoxantina (purina que se encuentra de forma natural en el organismo) y que actúa inhibiendo la xantina oxidasa a través de su metabolito el oxipurinol (Figura 6). Cuando el alopurinol es oxidado por la xantina oxidasa a oxipurinol bloquea la conversión de la hipoxantina a xantina oxidasa, productora de entre otros del ácido úrico.

Su utilización está aprobada por la “Food and Drug Administration” (FDA), para el tratamiento de la gota en aquellos pacientes que presentan altos niveles de ácido úrico (Muller, 2014).

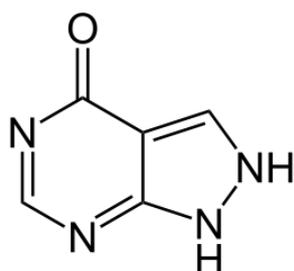


Figura 6. Estructura molecular del alopurinol

1.8.1 Alopurinol como neuroprotector

La xantina oxidasa es uno de los enzimas clave en la liberación de radicales libres después de un evento HI. El Alopurinol actúa inhibiendo la xantina oxidasa a través de

su metabolito, el oxipurinol, que bloquea la conversión de la hipoxantina a xantina oxidasa (Boda, 2011).

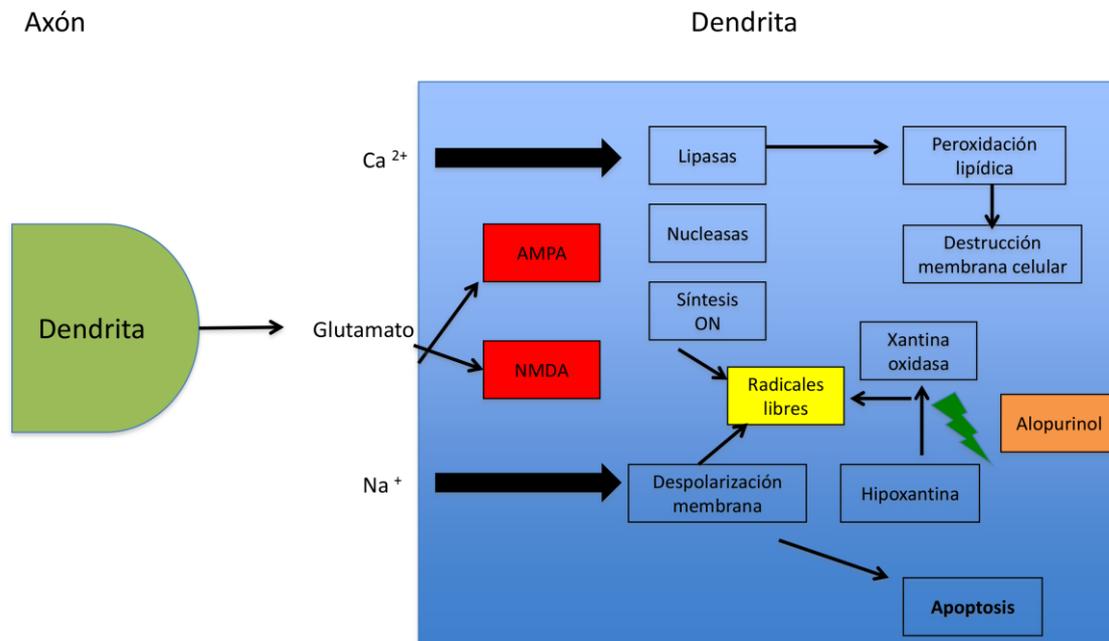


Figura 7. Esquema que ilustra donde actúa el alopurinol en la cascada de daño neuronal que acontece después de un evento HI. Acrónimos figura : NMDA: N-Metil-D-aspartato. AMPA: Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico. ON: Óxido nítrico

Por el mismo mecanismo inhibe la producción de reactivos tóxicos derivados del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido (Whitelaw, 2000), preservando el ATP (Williams, 1992) y reduciendo el edema que se produce después de un insulto hipóxico (Patt, 1988). Además en dosis altas actúa también como quelante del hierro no unido a las proteínas (Russell, 1995; Shadid, 1998) y tampón de radicales libres (Van Bel F, 1998).

Todas estas propiedades, sumadas a su demostrada inocuidad, bajo coste y su capacidad para pasar la barrera hemato-encefálica, fueron la base para que se empezaran los primeros estudios en modelos animales y en niños afectados de EHI (Palmer, 1990; Chaudhari, 2008).

Los primeros trabajos que se publicaron sobre el efecto neuroprotector del alopurinol fueron en modelos animales. Palmer y colaboradores demostraron, a principios de los 90, la eficacia del alopurinol como neuroprotector después de un evento HI (Palmer,

1990). Para ello, utilizaron crías de rata de 7 días a las que mediante el modelo de Ricce-Vannucci se les inducía un evento HI. Posteriormente, los animales eran randomizados en dos grupos, a unos se les administró alopurinol intraperitoneal, (130-138 mg/kg) y al grupo control se les inyectó la misma cantidad de suero salino (0.2 ml) intraperitoneal. A los 30 minutos de la administración del fármaco los animales fueron sometidos a una hipoxia con una mezcla de 8% de oxígeno y 92% nitrógeno a 37 °C durante 180 minutos. Para evaluar la eficacia del tratamiento, en un primer grupo se cuantificó el contenido de agua en el hemisferio dañado comparándose con el hemisferio preservado. Se obtuvo que los animales tratados con alopurinol presentaban un menor contenido de agua (89.07%) comparado con los animales que recibieron tratamiento con suero salino (91.64%).

En el segundo grupo animales sacrificados a los 30 días, se valoró el efecto neuroprotector mediante histología, dividiéndose el daño en: normal, leve, moderado o severo. Los resultados demostraron que los animales que recibieron alopurinol presentaban una menor alteración histológica. Sólo un 15.4% de los animales tratados con alopurinol presentaban alteraciones moderadas o severas comparadas con el 71.4% de los animales tratados con suero salino.

Un segundo trabajo del mismo grupo, aplicó el mismo tratamiento pero en este caso se administró el fármaco después del evento HI. Los resultados evidenciaron también una reducción en la cantidad de agua según el mismo método utilizado anteriormente en el hemisferio dañado en los animales tratados. En el caso de la valoración histopatológica se objetivó que ningún animal de los animales tratados con alopurinol presentaba un daño moderado o grave comparado con el 46.8% de los animales no tratados. Tampoco se objetivaron quistes en ninguna de las ratas tratadas con alopurinol mientras que el 50% de las ratas que recibieron suero presentaron algún grado de lesión quística. Con todo ello, los autores concluyeron que la administración del alopurinol a los 15 minutos post evento HI reducía el edema cerebral (fase aguda) y el grado de afectación histológica (Palmer, 1993).

Posteriormente a estos trabajos aparecieron otras publicaciones que profundizaron en otros mecanismos implicados en la reducción del daño cerebral (Tabla 3). Se evidenció que la administración de alopurinol tenía un efecto en la reducción del hierro no unido

a proteínas (Shadid, 1998), la inhibición de la degradación de la purina con un aumento de los niveles de adenosina y inosina (Marro, 2006) así como una disminución de los niveles de IL-1 β y FNT- α (Yamaguchi, 2015). También se reportó su papel en la disminución del edema y la mejoría en el daño histológico (Peeters-Scholte, 2003) ya evidenciando en los trabajos de Palmer.

Con el objetivo de prevenir la liberación inicial de radicales libres, algunos autores empezaron a trabajar con la hipótesis de administrar alopurinol de forma precoz, para evitar la liberación y/ o generación de radicales libres. Para ello, utilizaron un modelo de daño hipóxico intraútero, demostrando que el alopurinol tiene un buen paso transplacentario (Masoaka, 2005). La administración antenatal de alopurinol en modelos de HI fetal parece que también ofrece protección a nivel del sistema cardiovascular, disminuyendo la acidosis y las deceleraciones de la frecuencia cardíaca secundarias a la isquemia y reperfusión producidas por un sufrimiento fetal durante el parto (Derks, 2010).

Analizando el global de trabajos sobre la administración de alopurinol en modelos animales de EHI parece claro que se demostró que es un buen fármaco para ofrecer neuroprotección, siendo efectivo antes, durante o después de un evento HI. Así mismo, también se ha demostrado que gracias a su buen paso a nivel transplacentario es capaz de ofrecer neuroprotección aquellos modelos animales donde el feto está en riesgo de sufrir un evento HI (Masoaka, 2005; Kane, 2013; Kaandorp, 2014).

Autores	Animal	Método	Parámetros analizados	Resultados
Marro PJ, 1994	Cerdo	Administración post-evento HI a ALO (20 mg/kg) o SSF.	Medición de la actividad de la membrana celular (Na ⁺ K ⁺ /ATPasa) y de los productos de peroxidación lipídica como marcadores de función de la membrana cerebral y de su estructura.	Disminución de los niveles de ácido úrico y mejoría de la actividad de la bomba de membrana celular Na/K/ATPasa en los animales tratados con ALO.
Shadid M, 1998	Cordero	Post-evento hipóxico (<30 minutos) los animales fueron randomizados a SSF, ALO (20 mg/kg) o de deferoxamina (2.5 mg/kg).	Medición del hierro no unido a proteínas en plasma y en tejido cerebral.	Disminución de los niveles de hierro no unido a proteína en los animales tratados con ALO y deferoxamina comparados con el grupo placebo.
Peeters C, 2003	Rata	<i>In vitro</i> porciones de hipocampo de ratas de 8 días fueron expuestas a privación de oxígeno/glucosa durante 50 minutos. Se administró deferoxamine, ALO y oxypurinol durante y después de la privación.	Para medir la muerte celular se utilizó el yoduro de propidio.	No se objetivó protección <i>in vitro</i> de las neuronas de la región Ca1 del hipocampo a pesar de la inhibición de la xantina oxidasa en los animales tratados con ALO ni tampoco mediante la acción quelante del hierro por la deferoxamina.
Peeters-Scholte C, 2003	Cerdo	Animales randomizados a SSF, ALO (20 mg/kg) con otra dosis a las 12 horas (10 mg/kg) o deferoxamina (10 mg/kg) con otra dosis a las 12 horas (2.5 mg/kg).	El estado de energía cerebral se midió con RNMSp. La presencia de edema vasogénico por RNM T2. El daño celular cerebral se midió por analizando la actividad caspasa-3, histología.	Mejoría de la ratio fosfocreatinina/fosfato inorgánico y de la RNM pero no del daño histológico y de la actividad de la caspasa-3 en los animales tratados con ALO.
Marro PJ, 2006	Cerdo	Randomización a ALO (20 mg/kg) o SSF	Medición en tejido cerebral de los niveles de adenosina, inosina, purina así como de hipoxantina y xantina.	Inhibición de la degradación purinas con aumento de los niveles de adenosina y de inosina en el grupo de animales tratados con ALO. No hubo diferencias en los niveles de xantina y hipoxantina entre grupos.
Moretti A, 2013	Conejo	Los animales del grupo ALO recibieron 100 mg/kg i.p. diariamente durante dos días previos a la HI y otra dosis el mismo día. El grupo xantina recibió 600 μmol/kg 30 minutos antes de HI y 30 minutos después.	Medición de la actividad enzimática de las caspasas 3,8,9 en tejido cerebral de córtex, hipocampo, cerebelo, tálamo y núcleo caudado.	La administración de la xantina incremento los niveles de caspasa 3 pero sólo en el hipocampo. El tratamiento con alopurinol no la disminuyó. No se encontraron diferencias en otras regiones o cambios en la actividad de las caspasas 8 y 9.

Tabla 3. Resumen principales trabajos que valoran el efecto neuroprotector del alopurinol en modelos animales Acrónimos tabla: ALO: Alopurinol SSF: suero salino fisiológico. HIRNMSp : Resonancia magnética de espectroscopia por fósforo I.P.: intraperitoneal. HI: Hipoxia-isquemia.

1.8.2 Alopurinol en el recién nacido con EHI

Los buenos resultados obtenidos en los trabajos con animales, sugerían que el alopurinol sería una de las grandes promesas para el tratamiento de la EHI. A finales de los 90, Van Bel y colaboradores publicaron el primer estudio valorando la utilización de alopurinol en recién nacidos afectados de EHI grave (van Bel, 1998). El objetivo era determinar si la administración de alopurinol a dosis altas (40mg/kg ev 4 horas post evento) en recién nacidos afectados de EHI grave, implicaba una disminución en la formación de radicales libres (hierro no unido a las proteínas, ácido úrico) y en la peroxidación lipídica a nivel cerebral (malondialdehído). El objetivo secundario era evaluar si a nivel clínico, el alopurinol producía un cambio en la perfusión y actividad eléctrica del cerebro. En este trabajo, tal y como se había demostrado previamente en recién nacidos prematuros, aunque con dosis más bajas (20mg/kg) (Rusell, 1995), no se detectaron efectos secundarios relacionados con la administración del fármaco. Los pacientes del grupo alopurinol presentaron niveles de marcadores de estrés oxidativo más bajos. A nivel clínico, a pesar de ser un grupo muy pequeño de pacientes, los recién nacidos que habían recibido alopurinol presentaban una tendencia a mejores patrones no solo en el registro near infrared spectroscopy (NIRS), sino también el patrón electroencefalográfico, a pesar de que ello no se reflejaba en el resultado clínico final. El principal problema del estudio, tal como reconocieron los propios autores era el tamaño de la muestra (n=22) y que 5 de los 8 pacientes que tenían una EHI grave fallecieron, haciendo difícil obtener conclusiones.

El mismo grupo, unos años más tarde, presentaron un ensayo clínico en el que se reclutaron 32 pacientes con EHI grave a los que se les administró 40 mg/kg de alopurinol a las 4 horas de vida, repitiéndose la dosis a las 12 horas. Como *outcome* primario se evaluó la morbi-mortalidad, sin detectarse diferencias significativas entre los grupos. Los autores concluyeron que la administración de alopurinol horas después de la HI, podría no ser efectiva, ya que el mecanismo de actuación del mismo es inhibir la liberación de radicales libres (Bender, 2006). Otra de las limitaciones que apuntaron del estudio, era la gravedad de los pacientes incluidos, siendo en estos

casos muy difícil valorar la eficacia de la mayoría de terapias neuroprotectoras como había ocurrido también en otros estudios con terapias antioxidantes (Rogers, 2014; Merchant, 2015).

El año siguiente, Gunes (Gunes, 2007) y colaboradores publicaron un estudio con 60 niños afectados de EHI. Al primer grupo n=30 se les administró alopurinol 40mg/kg dosis durante 3 días, siendo la primera dosis dos horas después del evento HI, mientras que al segundo grupo se les administró placebo. A diferencia de los trabajos holandeses, este grupo turco, incluyó diferentes grados de encefalopatía (leve, moderada y grave) y estratificó los resultados según esta clasificación. Su objetivo principal era evaluar los niveles de NO en LCR y en sangre. Tras finalizar el trabajo, concluyeron, que los niveles de NO en LCR (las primeras 24 horas de vida) en los pacientes afectados de EHI moderada y grave eran más altos que en los sujetos del grupo control correlacionándose con la gravedad de la encefalopatía, corroborando el rol de NO en la fisiopatogenia de la asfixia. Las horas de administración del alopurinol, así como la dosis total administrada vario substancialmente a las administradas en el estudio holandés. A nivel clínico, este grupo apporto resultados a medio plazo (12 o mas meses), siendo mejores en el grupo alopurinol. No reportaron efectos adversos del fármaco.

Una revisión sistemática de la Cochrane Database realizada el año 2008, concluía que con los datos de los que se disponía en ese momento, no se podía recomendar la utilización del alopurinol como tratamiento estándar para los niños afectados de EHI, y que serían recomendables más trabajos para valorar su posible eficacia, aunque su seguridad ya había sido demostrada (Cochrane Database Syst Rev 2008).

El año 2012, el grupo holandés publico los resultados del seguimiento a largo plazo de los primeros estudios realizados (van Bel, 1998; Bender, 2006). No demostraron que el alopurinol ejerciera un efecto protector sobre el *outcome* primario (mortalidad y discapacidad severa a los 4-8 años) en el grupo de los pacientes con encefalopatía severa. Pero cuando se analizaron los pacientes tratados con alopurinol del grupo afecto de encefalopatía moderada, se observó que estos presentaban mejores resultados a largo plazo, concluyendo que la utilización de alopurinol podía ser

beneficiosa en este subgrupo de pacientes (Kaandorp, 2012). La revisión sistemática de la Cochrane Database de ese mismo año, no cambió sus conclusiones generales, pero si que abrió un poco más las expectativas en su valoración (Cochrane Database, 2012).

Ante los resultados obtenidos en los ensayos clínicos presentados, el mismo grupo holandés, (Torrance, 2009; Kandoorp, 2014) empezó a estudiar si la administración precoz de alopurinol, en el momento del parto en aquellas gestantes con alta sospecha de sufrimiento fetal, podría mejorar el perfil neuroprotector del fármaco. El objetivo era inhibir la liberación de radicales libres en la fase inicial del evento HI, antes de que empezara la fase de reperfusión. En la tabla 4 presentamos una relación de los trabajos publicados en los que se administró alopurinol en gestantes.

En líneas generales, todos ellos apoyaron la inocuidad del fármaco, ya que no se detectaron efectos adversos graves del mismo ni en las gestantes ni en los fetos. También se objetivó que la dosis administrada era suficiente para lograr un buen paso transplacentario y conseguir niveles plasmáticos en el feto. Para valorar el grado de neuroprotección ofrecida se determinaron los niveles de PS100 β en sangre de cordón, sin detectarse diferencias significativas entre grupos, a pesar que el análisis post-hoc se objetivó que los fetos de sexo femenino presentaban unos niveles más bajos de PS100 β .

La mayoría de trabajos publicados sobre la eficacia del alopurinol, consideran que se trata de un buen fármaco, y que su mecanismo de acción puede ser clave en la limitación de la liberación de radicales libres. Es por ello que su administración debería ser precoz, en las fases iniciales.

En la actualidad hay dos ensayos clínicos que están evaluando el efecto del alopurinol administrando precozmente, uno durante el parto (NCT00189007) y otro inmediatamente después (the European ALBINO trial).

Autores	Métodos	Resultados	Conclusiones
Torrance et al. Pediatrics 2009	<p>Estudio randomizado. Embarazadas (>36 semanas) con signos de hipoxia fetal que se les administra alopurinol vs placebo endovenoso. La severidad del daño se midió analizando láctico, PS100β y Fe no unido a proteínas en sangre de cordón. Se midieron los niveles de alopurinol y oxipurinol en sangre materna y de cordón.</p>	<p>Niveles de alopurinol y oxipurinol en rango terapéutico en sangre materna pero no en sangre de cordón.</p> <p>En aquellas muestras de cordón que los niveles estaban en rango terapéutico los niveles de PS100β si que fueron más bajos que en los otros grupos (p<0.01).</p>	<p>En aquellos neonatos en los que el alopurinol/oxipurinol cruzó la placenta en suficiente cantidad para adquirir concentraciones terapéuticas los niveles de PS100β en sangre de cordón fueron más bajos.</p>
Kandoorp et al.Arch Dis Child Fetal Neonatal, 2014	<p>Ensayo clínico multicéntrico randomizado, a doble ciego comparando alopurinol en gestantes vs placebo en casos de hipoxia fetal inminente.</p> <p>58 gestantes con sospecha de hipoxia fetal.</p> <p>Se administro 500 mg alopurinol intravenoso a las madres justo antes del parto.</p> <p>Se analizo disponibilidad del fármaco (concentraciones en plasma materno y cordón umbilical) y seguridad farmacológica (efectos adversos maternos y fetales).</p>	<p>Niveles terapéuticos de alopurinol en sangre materna a los 5 min de administración.</p> <p>Todas las muestras de cordón analizadas, 95% (52/55) tenían concentraciones plasmáticas adecuadas de alopurinol.</p> <p>No se observaron efectos secundarios en los recién nacidos.</p> <p>2 madres presentaron durante la infusión dolor o enrojecimiento en el brazo.</p>	<p>La dosis de Alopurinol administraba tenia un buen paso placentario y un 95% de los fetos tratados presentan en el momento del nacimiento niveles terapéuticos sin presentar en ninguno de ellos efectos secundarios.</p>
Kandoorp et al.Arch Dis Child Fetal Neonatal, 2015	<p>Estudio randomizado multicéntrico. Gestantes con dinámica de parto con sospecha de hipoxia fetal finalizándose de forma urgente.</p> <p>Alopurinol vs placebo.</p> <p>El outcome principal es medir la PS100β en cordón umbilical</p>	<p>222 gestantes randomizadas.</p> <p>No hubo diferencias significativas en los niveles de PS100B entre ambos grupos.</p> <p>sSe detectaron niveles mász bajos de PS100b en los recién nacidos niña tratados con Alopurinol</p>	<p>El tratamiento materno con alopurinol no disminuyó los marcadores de daño neuronal en sangre de cordón umbilical. Cierta beneficio en el sexo femenino.</p> <p>Proponen valorar el tratamiento con alopurinol vía cordón umbilical en sala de partos post-evento hipóxico</p>

Tabla 4. Resumen de los diferentes estudios realizados con alopurinol administrado en madres gestantes con fetos con riesgo de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). Acrónimos tabla: PS100β: Proteína PS100β. Fe: Hierro Ev: endovenoso.

1.9 Neuroprotección y diferencias según sexo

Los neonatos de sexo masculino afectados de EHI presentan una incidencia más elevada tanto de la gravedad como de secuencias a largo plazo comparados con el sexo opuesto para un insulto de similares características (Rutter, 2003; Mayoral, 2009; Smith, 2014; Huang, 2016). Estas diferencias se han visto confirmadas en diferentes modelos animales de daño HI (Hurn, 2005).

Existen una serie de condicionantes que podrían influir en esta diferencia como son las hormonas ya presentes en época fetal (Yang, 2002) o las diferencias vías de activación dependientes de las caspasas que llevan a la muerte apoptótica (Nie, 2016), llevando a los machos a ser mas vulnerables a los insultos perinatales (Repolleau, 2007). No sólo eso, las hembras también presentan una predisposición genética gracias a determinados genes inhibidores de la apoptosis que ofrecen una protección innata después de un evento HI (Carrel, 2005).

A nivel hormonal la presencia de testosterona incrementa la toxicidad dependiente del glutamato después de una lesión HI (Yang, 2002), incrementando la lesión del infarto (Cheng, 2007), así como los andrógenos que potencian la lesión del daño cerebral (Nuñez, 2008). Por el lado contrario, los estrógenos parecen ejercer un efecto protector disminuyendo el tamaño de la lesión (Nuñez, 2008).

Cuando se analiza la vía de la cascada apoptótica los resultados evidencian que en las hembras juega un papel primordial, mostrando niveles incrementados de citocromo-C dependiente de la caspasa en el hipocampo después de un evento HI (Weis, 2012), mientras que en los machos la lesión esta lesión es independiente de la caspasa, siendo clave la vía que depende del factor inductor de la apoptosis (FIA) (Fitch, 2012).

Por último las diferencias de daño HI dependiente del sexo incluyen también inhibidores endógenos de la apoptosis. Existe una familia de proteínas, conocida como los inhibidores de la apoptosis, capaces de inhibir la muerte celular regulando la

apoptosis bloqueando los mecanismos intrínsecos y extrínsecos (Hill, 2007). En el sexo femenino podemos encontrar una mayor expresión de estas proteínas.

Así, estos tres mecanismos: las hormonas, la vía de las caspasas y los factores inhibidores de la apoptosis, interactúan entre ellos influenciando en el grado de la lesión HI, abriendo así la posibilidad de diferentes tratamientos neuroprotectores según el sexo del paciente.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 Hipótesis y Objetivos

La administración de alopurinol en la fase aguda después de un evento hipóxico-isquémico, asociado al tratamiento con hipotermia moderada sostenida, mejorará la neuroprotección en los animales sometidos a un modelo de EHI en cría de rata.

Los **objetivos principales** de este trabajo fueron:

- 1/ Validar una nueva técnica de extracción de líquido cefalorraquídeo en crías de rata entre 7 y 12 días, para poder determinar biomarcadores en LCR.
- 2/ Determinar si la terapia combinada (hipotermia + alopurinol) en un modelo animal de EHI confiere una mejor neuroprotección y si ésta es mejor que la hipotermia sola.

Los **objetivos secundarios** del trabajo fueron:

- 1/ Calcular si existen diferencias en los valores de proteína S100 β en líquido cefalorraquídeo en las crías de ratas en función de los días de vida.
- 2/ Concluir si existen diferencias en los valores de proteína S100 β en líquido cefalorraquídeo entre los animales controles y los animales del grupo daño.
- 3/ Delimitar si el tratamiento neuroprotector (hipotermia + alopurinol) modifica de forma diferencial los niveles de caspasa 3 activada en tejido cerebral 24 horas post evento HI.
- 4/ Determinar si la terapia combinada (hipotermia + alopurinol) modifica de forma diferencial las lesiones histológicas a nivel de tamaño del infarto, volumen del hipocampo y graduación neuropatológica a las 72 horas post-evento HI comparada con los otros tratamientos.

5/ Evaluar si el tratamiento neuroprotector (hipotermia + alopurinol) modifica de forma diferencial los resultados que presentan los animales en el test de geotaxis negativa.

6/ Decidir si el tratamiento neuroprotector (hipotermia + alopurinol) modifica de los resultados que presentan los animales en el laberinto acuático de Morris.

7/ Valorar la influencia del sexo sobre el efecto neuroprotector de las diferentes terapias.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1 Animales y estabularización

Se utilizaron un total de 315 crías de rata Wistar con edades comprendidas entre 7 y 12 días (P7-P12) (pesos 12-24 gramos) procedentes de 10 parejas de ratas Wistar adultas (Harlam Ibérica). Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (08:00-20:00) y en condiciones controladas de humedad ($50\% \pm 10\%$) y temperatura (22 ± 2 °C), siendo estas condiciones consideradas las óptimas para estos animales.

El estudio se realizó en la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Sant Joan de Déu de la Universidad de Barcelona. El procedimiento fue aprobado por el comité de experimentación animal de la Universidad de Barcelona (CEEA) en cumplimiento del Decreto 214/97 de la Generalitat de Catalunya, 2010/63/UE de la Unión europea y RD 53/2013 de España. Número de permiso 6575.

Las crías de rata se mantuvieron con la madre hasta el momento de la intervención quirúrgica con acceso libre a la alimentación materna. Las madres fueron alimentadas según el protocolo habitual.

Entre los 7 y 12 días de vida las crías fueron sometidas a los procedimientos descritos posteriormente (apartado 3.2.1). Después de ello fueron retornadas con las madres.

Los animales fueron destetados a los 25 días de vida. Se separaron en jaulas según sexos, nunca con más de 5 animales por jaula. Durante este período tuvieron libre accesos a comida estándar y agua.

Al finalizar el protocolo experimental, a los 35 días de vida, fueron sacrificadas con sobredosis de anestesia según protocolo. (Anexo 1)

El presente trabajo consta de cuatro bloques, para los cuales se utilizaron los animales en diferentes edades (desde p7 hasta p35).

a/ Experimento 1: (N=46) Validación de la técnica de extracción de líquido cefaloraquídeo (LCR) en crías de rata. Los animales utilizados fueron crías de rata de p7 a p12. Todos ellos fueron sacrificados con inyección anestésica después de la obtención de LCR.

b/ Experimento 2: (N=44) Estudio de la actividad de la caspasa-3 activada 24 horas después del evento HI (p11). Se utilizaron animales de p11. Todos ellos fueron sacrificadas después con inyección anestésica.

c/ Experimento 3: (N=44) Estudio del daño cerebral a nivel histológico p13. Se utilizaron animales de p13. Estos fueron anestesiados con isofluorano (sobredosis) y fueron transfundidos con paraformaldehído. Se administró también sobredosis anestésica.

d/ Experimento 4: (N=181) Valoración funcional y estudios de biología molecular. Para esta parte se utilizaron animales entre p25 y p35. Estos realizaron diferentes test motores y de aprendizaje y posteriormente fueron sacrificados con sobredosis anestésica y fueron transfundidos con paraformaldehído.

En el estabulario de Sant Joan de Déu existe un control diario del estado de los animales para evitar el sufrimiento de los mismos. Se valora el estado general del animal, mediante la observación de su aspecto, comportamiento y control de peso. Así mismo, los animales son controlados por los técnicos del estabulario durante el período post-intervención quirúrgico.

Estos protocolos se incluyen en el anexo 1.

3.2 Diseño experimental. Esquema de trabajo

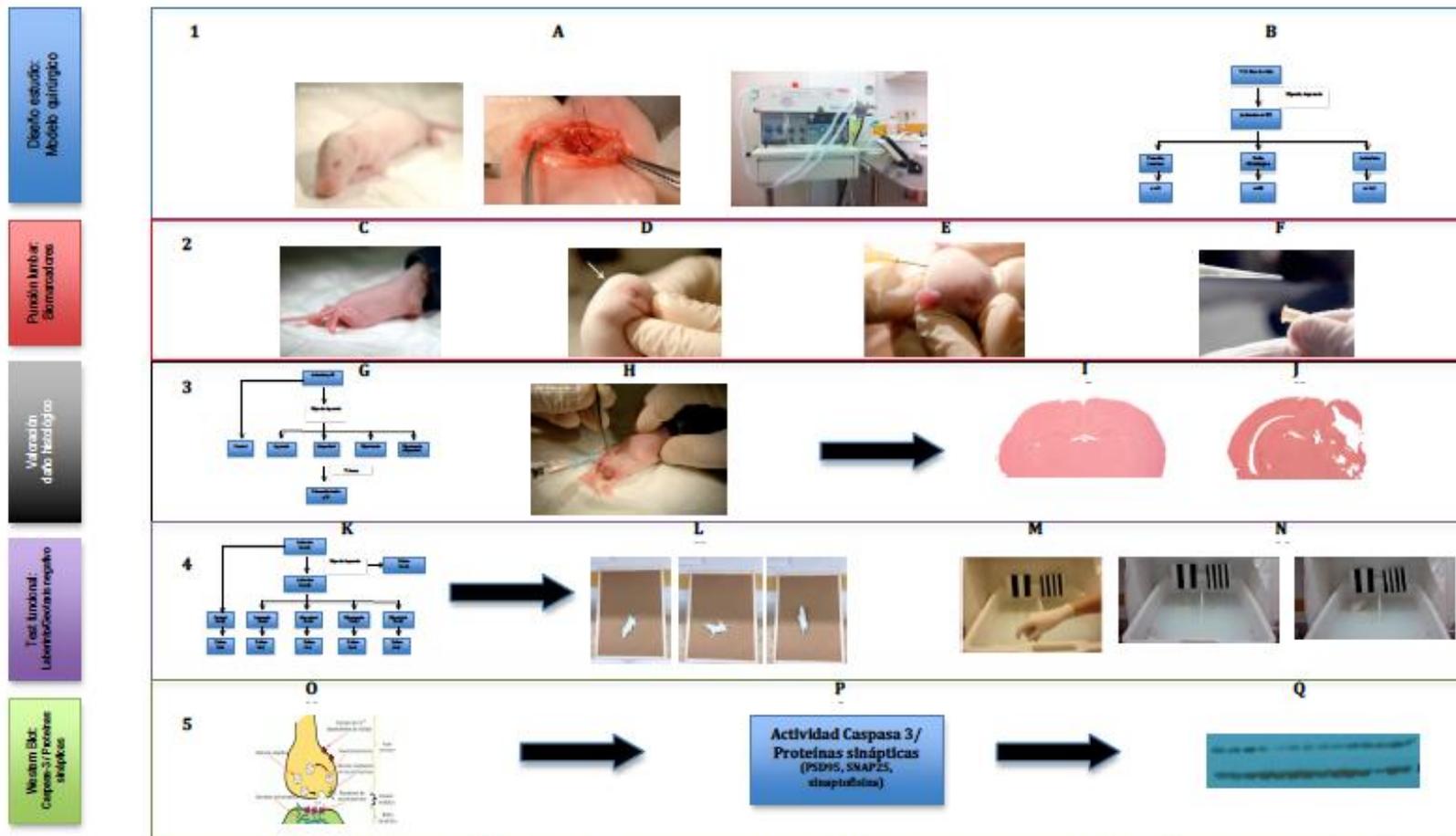


Figura 8. Representación gráfica y esquemática de las diferentes fases del trabajo. Panel 1 : (A) Imágenes que representan la ligadura unilateral de la carótida en crías de rata entre p7 y p12 y posterior hipoxia al 8% durante 90 minutos. (B) Los animales se dividieron en 3 grupos. Un primer grupo se utilizó para determinar marcadores de daño neuronal en LCR, un segundo grupo para valorar el daño histológico y un tercero para analizar el aprendizaje mediante un laberinto de Morris y el estudio de las proteínas sinápticas. Panel 2 : Imágenes que ilustran la técnica punción lumbar en los animales entre 7 y 12 días. (C) Anestesia (D) Posición cabeza en ángulo 90° (E) Inserción de aguja en perpendicular (F) Obtención espontánea de LCR. Panel 3 : Valoración daño histológico. (G) Los animales p10 se sometieron a HI dividiéndose en 5 grupos según el tratamiento administrado. (H) A las 72 horas se sacrificaron. (I) (J) Se realizaron cortes histológicos para objetivar el efecto de las terapias neuroprotectoras. Panel 4: Análisis de la memoria tiempo-espacial. (K) Los animales p10 se sometieron al insulto HI clasificándose en 5 grupos. (L) A los 15 días realizaron el test geotaxis negativo, en las imágenes se puede ver como el animal pivota para girar en una plataforma inclinada en 45 C.A los 25 días empezaron el laberinto acuático de Morris. (M) (N) Diferentes imágenes que ilustran el aprendizaje de los animales. A los 35 días se sacrificaron. Panel 5 : (O) Caracterización molecular de las variaciones proteicas a nivel de la sinapsis. (P) En los animales p11 24 horas después del evento HI se midieron los niveles de caspasa-3. En los animales p35 después de la realización del laberinto de Morris se analizaron diferentes valores de proteínas sinápticas para valorar si había una correlación con el aprendizaje de los animales según el tratamiento neuroprotector. (Q) Su análisis se realizó mediante técnicas de Western-Blott.

3.2.1 Grupos estudio

Los animales utilizados en las diferentes partes de proyecto se randomizaron en los siguientes grupos:

Grupo 1 Control: (grupo Sham-Operated). Los animales de este grupo, fueron sometidos al mismo protocolo quirúrgico descrito posteriormente (anestesia, incisión supraclavicular y visualización del paquete vascular) pero no se les realizó ninguna manipulación de los vasos, tampoco fueron sometidos hipoxia. La duración del tiempo de anestesia fue similar a la de los otros grupos.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico se mantuvieron en un ambiente normotérmico a 36.5 °C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

Grupo 2 Daño: (grupo Hipoxia) Se realizó el procedimiento quirúrgico según el método para inducción de hipoxia-isquemia de Rice-Vannucci. Después de la hipoxia se administró suero salino fisiológico (0.2-0.3ml) intraperitoneal. Posteriormente al procedimiento, se mantuvieron en ambiente normotérmico a 36.5 °C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

Grupo 3 Alopurinol: (grupo Alopurinol) Se realizó el procedimiento quirúrgico según el método Rice-Vannucci. A los 5 minutos post-hipoxia se les administró 135 mg/kg (0.2-0.3ml) de alopurinol intraperitoneal, pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park).

Al igual que los animales de los dos grupos anteriores, posteriormente al procedimiento quirúrgico se mantuvieron en ambiente normotérmico a 36.5 °C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

Grupo 4 Hipotermia: (grupo Hipotermia) Se realizó el procedimiento quirúrgico según el método Rice-Vannucci. Después de la hipoxia se administró suero salino fisiológico (0.2-0.3ml) intraperitoneal. Posteriormente se mantuvieron en hipotermia controlada a 33 °C durante 5 horas, a continuación fueron devueltos con sus madres.

Grupo 5: (grupo Hipotermia + Alopurinol). Se realizó el procedimiento según el método Rice-Vannucci. A los 5 minutos post-hipoxia se les administró 135 mg/kg (0.2-0.3ml) de alopurinol intraperitoneal, pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park). Posteriormente se mantuvieron en hipotermia controlada a 33 °C durante 5 horas y a continuación fueron devueltos con sus madres.

3.2.2 Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica

Para la inducción de EHI se utilizó la técnica ya validada y ampliamente utilizada en la literatura de Rice-Vannucci (Rice, 1981), que describimos brevemente a continuación: Los animales fueron anestesiados con isofluorano inhalado (Inducción: 4%; mantenimiento: 2% vaporizado en oxígeno a 3 l/min) y se mantuvieron a 36.5-37 °C durante todo el procedimiento.

Para la realización del protocolo quirúrgico se utilizó un microscopio quirúrgico.

A continuación se describe el protocolo utilizado:

Los animales son sometidos a una incisión a nivel supraclavicular en la cara antero lateral izquierda. Una vez expuesto y disecado el tejido adiposo se visualiza el paquete vascular que incluye la vena yugular, la arteria carótida y el nervio vago. Se procede a la disección de los mismos y una vez aislada la arteria carótida se realiza una doble sutura con seda de 3.0 y posterior electrocoagulación según el método descrito previamente por el grupo de Martínez-Orgado (Fernández-López D, 2007). Posteriormente se cierra la incisión quirúrgica con una sutura simple.

Al despertar de la cirugía, las crías se devuelven con la madre durante 30 minutos. Posteriormente se someterán a hipoxia. Existen diferentes protocolos de hipoxia según tipo de lesión deseada. Para nuestro trabajo en las condiciones de latitud en las que se encuentra en nuestra ciudad y para conseguir un daño moderado, sometimos a nuestros animales a una atmósfera al 8% de oxígeno durante 90 minutos a 36.5° C.

Consideramos daño moderado aquel en el que había una mortalidad post-evento hipóxico entre el 10-15%.

Una vez finalizado el tratamiento los animales fueron devueltos con sus madres.

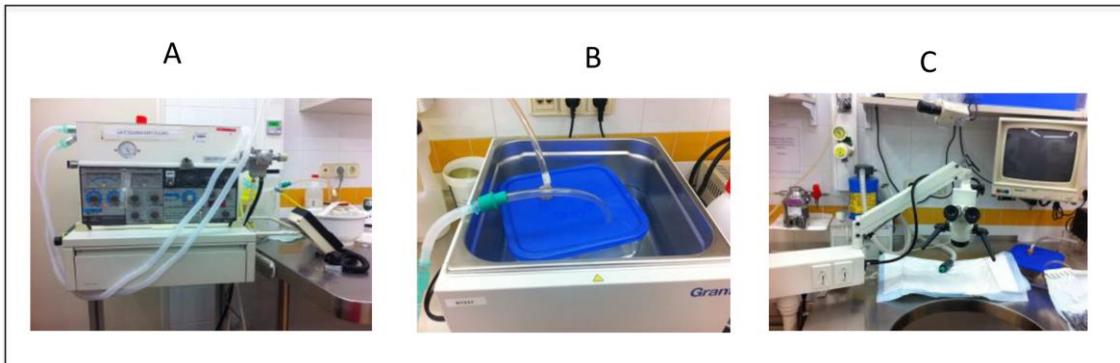


Figura 9. Material utilizado para el modelo hipoxia-isquemia. (A) Mezclador de gases: Para conseguir la mezcla de gases hipóxicos utilizamos un respirador SERVO 900 con la adaptación de las tubuladuras a una conexión de oxígeno y a otro de óxido nitroso. Con ello obtuvimos una mezcla gaseosa de oxígeno al 8%. Para comprobarlo se utilizó un sensor de oxígeno B) Recipiente de cristal utilizado como cámara hipóxica: En la superficie se pueden observar dos orificios, uno de ellos es la rama inspiratoria de la mezcla de gases y el otro la rama espiratoria. En la imagen se puede apreciar que la cámara se encuentra introducida en un recipiente de agua para regular la temperatura. (C) Para realizar la el procedimiento quirúrgico se utilizó el microscopio que aparece en la figura.

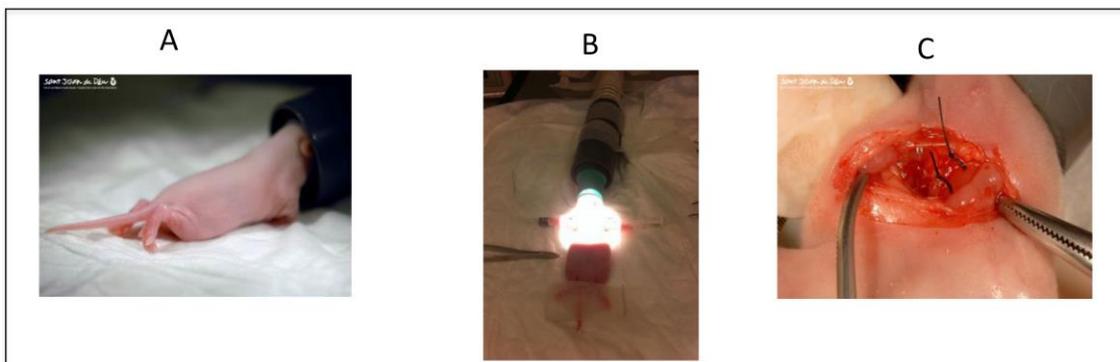


Figura 10. Diferentes momentos del procedimiento quirúrgico : (A) Inducción anestésica (mezcla de isoflurano y oxígeno). (B) Colocación del animal en posición supina, los brazos y la cabeza extendidos para la correcta disección del paquete vascular izquierdo. (C) Visualización directa de la sutura, realizada mediante la técnica descrita (disección del paquete vascular con ligadura de la carótida izquierda separando la vena yugular y el nervio recurrente).

3.2.3 Tratamiento con hipotermia

En todos los animales, el tratamiento se inició 15 minutos después de la finalización de la hipoxia. Los animales se randomizaron en dos grupos: normotermia e hipotermia. Los animales del **grupo normotermia**, se colocaron en una cámara de cristal que mantuvo sumergida en agua a temperatura estable a 36-37º durante 5 horas. Los animales del **grupo hipotermia**, se colocaron en una cámara con las mismas características con la temperatura del agua necesaria para que la temperatura rectal de los animales fuese de 32-33ºC. A las 5 horas, los animales de ambos grupos se devolvieron con sus madres.

La duración y el nivel de temperatura se estableció según datos de otros trabajos de la literatura (Sabir, 2012).

En la Figura 11 se puede visualizar como se procede al control de temperatura.



Figura 11. Tratamiento mediante hipotermia. Los animales se colocaron en un recipiente de cristal sumergida en una fuente con capacidad de termorregulación. Los animales se mantuvieron entre 32-33ºC. Para evitar que los animales se transmitiesen calor unos a otros se colocaron separadores entre ellos.

3.2.4 Tratamiento con alopurinol

Cinco minutos después de finalizar el procedimiento quirúrgico y antes de empezar la hipotermia, los animales randomizados al grupo alopurinol recibieron 135 mg/kg de Alopurinol pH 11.2 (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle ParI)

intraperitoneal. La dosis administrada se decidió a partir de la revisión de la literatura previa, siendo la utilizada a finales de siglo pasado por Palmer (Palmer 1990,; Palmer 1993).

Los animales randomizados al grupo de no tratamiento con alopurinol se les administró el volumen equivalente de suero salino fisiológico (0.2-0.3 ml) también intraperitoneal.



Figura 12. Administración intraperitoneal alopurinol administración intraperitoneal de alopurinol o de un volumen equivalente de suero salino fisiológico (0.2-0.3ml).

EXPERIMENTO 1:

3.3 Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR). Valoración biológica (biomarcadores)

3.3.1 Extracción de LCR mediante punción de cisterna magna

Para realizar la extracción de LCR validamos una nueva técnica que se describe a continuación (Rodríguez-Fanjul, 2015).

Para ello se utilizaron crías de rata de entre 7 y 12 días de vida (N=46). Los animales se colocaron en una superficie estéril y se anestesiaron con isoflurano (4%). Para la realización de la punción, uno de los investigadores sujeta al animal posicionándolo con el cuello flexionado, de forma que la cabeza queda en un ángulo de 90° facilitando la visualización de un espacio de forma romboidea entre el orificio occipital y el inicio de la columna cervical. Se localiza en la línea media entre las dos orejas, siendo fácilmente palpable. Un segundo investigador, guiándose por palpación, introduce una aguja de 24-G de forma perpendicular, con el bisel hacia arriba, a una profundidad de entre 0,5-1 mm. Cuando se detecta salida del LCR, este se recoge, mediante una pipeta automática y se transfiere a un tubo Eppendorf. Las muestras visualmente hemáticas se descartaron.

El LCR recogido se conservó a -80 °C para su posterior análisis. Después de la extracción, los animales fueron sacrificados.

3.3.2 Determinación de biomarcadores en LCR

Para realizar la determinación de los niveles de proteína S100 β se utilizó el ELISA *kit for S100 Calcium Binding Protein* USCN Life Science. Las muestras fueron procesadas a una dilución de 1/20.

Como grupo control a la normalidad (n=41) se utilizó muestras de animales sometidos al modelo de daño HI de Rice-Vannuci previamente descrito (n=5).

Esta parte del trabajo ha sido publicada en la revista *Journal of Experimental Neuroscience* (Rodríguez-Fanjul, 2015) Adjuntamos el artículo completo en el (Anexo 2).

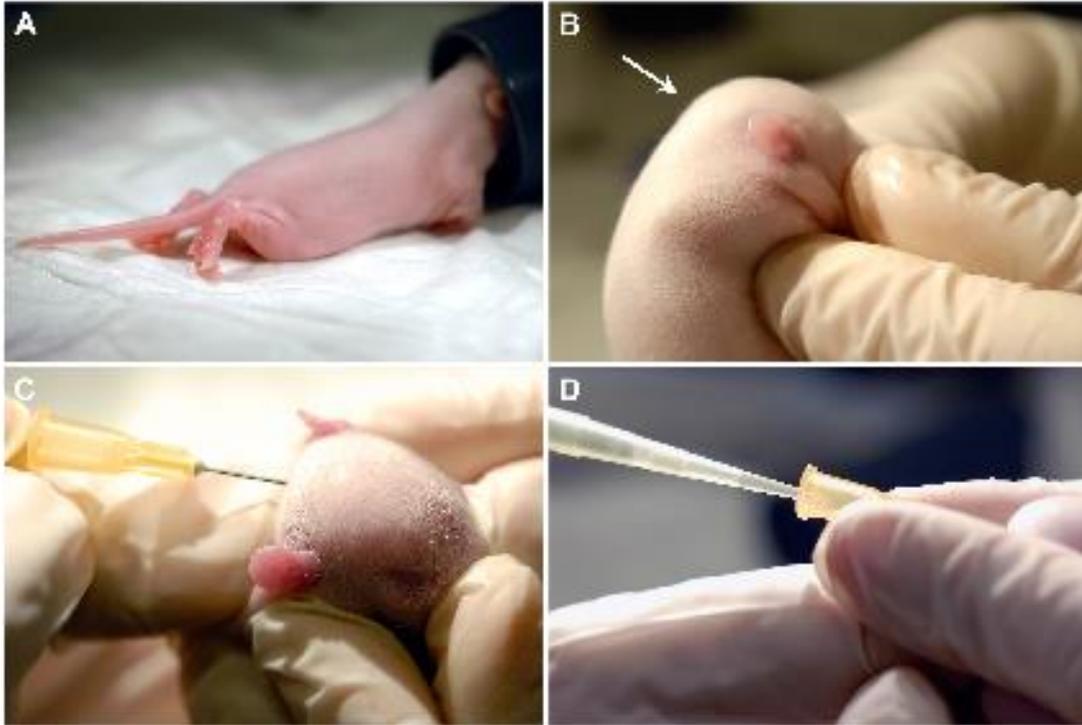


Figura 13. Técnica de recogida de LCR. (A) Inducción anestésica (B) Posicionamiento del animal en un ángulo de 90°. La flecha muestra el punto de punción. (C) aguja de 24 G, bisel hacia arriba, insertado perpendicular. (D) LCR recogido con una pipeta 20 μ l.

EXPERIMENTO 2:

Esta parte del trabajo ha sido publicada en la revista *Plos One* (Rodríguez-Fanjul, 2017)
Adjuntamos el artículo completo en el (Anexo 3).

3.4 Valoración de las diferentes vías de activación de la apoptosis

3.4.1 Medición actividad de la caspasa-3

Disección cerebro

Las caspasas en general y la caspasa-3 activada en particular, es considerada una de las principales moléculas que participan en la vía dependiente de las caspasa, capaces de activar la muerte celular programada o apoptosis. Su determinación se ha utilizado en múltiples trabajos para demostrar la activación de la vía apoptótica y cuantificar la apoptosis de forma indirecta.

Para determinar su actividad en los diferentes grupos, se utilizaron animales operados a los p10 días de vida siendo randomizados tal como se ha explicado en el apartado 3.3 en 5 grupos. Se utilizaron 44 animales.

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas de la HI (P11) previa anestesia (isofluorano) mediante una inyección de intraperitoneal de anestésico (Pentotal). Posteriormente fueron pesados y los cerebros se extrajeron en bloque y se conservaron a -80 °C.

Para su utilización, el cerebro congelado fue seccionado en cortes coronales de un grosor de 3 mm aproximadamente, encima de placas metálicas mantenidas en hielo seco. La localización del hipocampo y su disección se realizó bajo un esteromicroscopio Nikon SMZ645 (16-100x) utilizando una base de hielo seco para no romper la cadena de frío.

Extracción proteica

Los hipocampos diseccionados y congelados se disgregaron utilizando homogeneizadores de vidrio "Douncer" mantenidos en hielo y en el tampón de lisis Laemmli (Stock 1.8 x: 50 mM Tris –pH 7.4-, 150 mM 0.9% Na CL, 1% NP 40, 2mM EDTA, 10 mM Na β -glicerofosfato, 2 mM EGTA, 5 mM Na pirofosfato completando la solución a 1X con 1 mM Na₃VO₄, 0.1% β - Mercaptoetanol, 1X Coctail inhibidor proteasa (Roche-Complete Mini Cat#1836153) 1mM PMSF, 50 mM NaF, 25 mM NEM-etilmaleinida.). Se realizaron 50 golpes con un émbolo de menor diámetro y otros 50 con un émbolo de mayor tamaño. Los lisados proteicos se mantuvieron en hielo 30 minutos y se sometieron a 5 ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno espaciados por 1 minuto en hielo (Sonics Vibra-cell, sonda de 64 mm y amplitud de 23%). Los homogenizados se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Eppendorf 5427R) y se recogieron los sobrenadantes. Se determinó la concentración de proteína mediante el Método Bradford y se utilizó una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina bovina (BSA). Los lisados se almacenaron a - 80 °C hasta su análisis por Western-Blot.

Western-blot

Posteriormente los extractos de proteínas fueron separados mediante SDS-PAGE y electro-transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron tamponadas con un solución de leche seca al 5% en un buffer salino y incubadas con anticuerpos primarios contra caspasa- activada ((Asp175) (5A1E) Rabbit #Cell signaling, 1/500) y GAPDH (D16H11) XP Rabbit #Cell signaling, 1/20000) como control de carga.

Posteriormente con su correspondiente anticuerpo secundario HRP-conjugado (PROMEGA anti-Rabbit 1/5000). La señal de proteína fue medida usando el sistema quimioluminiscente (Amersham, Buckinghamshire, UK).

EXPERIMENTO 3:

3.5 Valoración daño histológico (tamaño del infarto, tamaño hipocampo, score neuropatológico)

Para realizar esta parte del trabajo se utilizaron animales operados en P10 (N=44), randomizándose en los 5 grupos. A las 72 horas del procedimiento quirúrgico, las ratas fueron sacrificadas (P13) mediante una sobredosis anestésica (isoflurano) y perfundidos intracardiamente con paraformaldehído. Posteriormente los cerebros fueron extraídos y se fijaron durante 6 horas en PFA. Se realizaron cortes coronales de 40 µm de grosor y se mantuvieron con una solución crioprotectora (0.1 M buffer fosfato, glicerol y etilenglicol) y guardados durante -30 °C para su posterior estudio. Para el análisis histológico las secciones de tejido se montaron en porciones recubiertas de polisina y tintadas en hematoxilina-eosina (H-E). A continuación se realizaron micrografías de todo el corte cerebral con un microscópico óptico Nikon Eclipse 800 (Nikon, Tokyo, Japón).

La medición del tamaño de la lesión se realizó de forma ciega por dos investigadores.

Se realizó esta medición a las 72 horas según múltiples referencias bibliográficas es el momento en que se puede valorar el máximo daño cerebral (Sabir, 2012).

Medición tamaño infarto e hipocampo

Para determinar el tamaño del infarto se realizaron cortes coronales y se procedió a su tinción con hematoxilina-eosina. De cada corte se identificó la línea media y se delinearon ambos hemisferios (izquierdo vs derecho). Dos cortes de cada bloque, que incluían el córtex, hipocampo, ganglios de la base y tálamo fueron escaneados con una resolución de 1200 dpi. Para poder medir el área de tejido viable en cada hemisferio, derecho o izquierdo, se utilizó el programa Image J (ImageJ, versión 1.48, National

Institutes of Health, USA; www.NHI.gov). La medición del ratio de cada área se calculó a partir de cada una de las dos secciones del cerebro obteniéndose el porcentaje de área perdida ($1 - (\text{Ratio del área (derecho vs izquierdo)})$) (Sabir H, 2014).

Para la medición del tamaño del área del hipocampo se comparó igual que en el caso del córtex el área contralateral con la del hipocampo ipsilateral.

Score neuropatológico

Otra de las técnicas utilizadas en la bibliografía, para la valoración del daño cerebral histológico es el *score* neuropatológico de Thorensen. Con él se interpretan diferentes grados de lesión celular a nivel del córtex cerebral y del hipocampo (Thorensen, 1996).

A continuación se describe como se evalúan los diferentes cortes histológicos.

Evaluación del córtex cerebral, se puntuará cada corte según los valores reportados a continuación:

0: No daño histológico.

1: < 10% de área afectada; infartos pequeños, parcheados o incompletos.

2: 20-30% de área afectada; infartos parcialmente confluentes.

3: 40-60% de área afectada, con infartos grandes y confluentes.

4: >75% de área afectada, destrucción total del tejido.

Evaluación del hipocampo, se puntuará cada corte según los valores reportados a continuación:

0: No daño histológico.

1: <20% de área afectada, neuronas necróticas solo en las áreas más laterales.

2: 50% de área afectada, con áreas parcheadas en todos los sectores.

3: 75% de área afectada, con áreas más extensas de neuronas necróticas.

4: 100% de área afectada, infarto completo del hipocampo incluyendo el giro dentado.

EXPERIMENTO 4:

3.6 Evaluación funcional motora y del aprendizaje

Test de Geotáxico Negativo

Para poder valorar los reflejos de neurocomportamiento temprano se realizó el test geotáxico negativo (N=35). Este test consiste en valorar la capacidad que tiene una cría de rata en reposicionarse sobre una superficie inclinada. Esto es una respuesta postural innata que aparece sobre los 15 días de vida (Smit, 2015).

Se utilizaron animales operados a los 10 días de vida que se randomizaron en los 5 grupos de estudio. Estos animales una vez intervenidos fueron retornados con sus madres.

Los animales empezaron el entrenamiento a los 15 días de vida (5 días después del episodio HI) y se entrenaron durante 3 días consecutivos. Cada animal realizó el test 1 vez al día. Los animales fueron sacrificados posteriormente.

Para la realización del test se utilizó una plataforma inclinada donde el animal es capaz de pivotar y girarse. Esta plataforma se dejó en un ángulo inclinado de 45 °. El test evalúa el tiempo que necesita cada animal para que recolocarse en un giro de 180 ° y colocarse con la cabeza posicionada boca arriba.

Al finalizar el test, a los 18 días de vida, los animales fueron pesados y sacrificados.

En la figura 14 mostramos como se realiza el test geotáxico negativo.



Figura 14. Test geotáxico negativo. Los animales se colocan en una superficie inclinada de 45 ° posicionándose boca abajo, evaluándose el tiempo necesario que precisa el animal para recolocarse en un giro de 180 °.

Test de memoria temporo-espacial y de aprendizaje (Laberinto de Morris)

Para realizar una valoración neurológica a largo plazo se escogió evaluar la memoria temporo-espacial y el aprendizaje (N=151).

La evaluación de la memoria temporo-espacial se realizó mediante el laberinto acuático de Morris, versión modificada para animal pequeño.

Para ello se utilizaron animales operados a los 10 días de vida, que se randomizaron en los 5 grupos del estudio. Estos animales, una vez operados fueron retornados con sus madres y se destetaron a los 25 días de vida manteniéndose en jaulas con menos de 5 animales en cada una y separados por sexos.

Las ratas son animales que se desenvuelven bien en el agua, tienen una buena capacidad para desplazarse en ese medio, pero no les es agradable así que intentan evadirse lo antes posible del mismo para poder acceder de nuevo al medio terrestre.

El motivo de utilizar el laberinto acuático y no el laberinto clásico terrestre fue que dado que la motivación en el laberinto acuático es poder escapar del agua y no la privación de alimento, esto permite que los animales se encuentren en mejores condiciones físicas y estén menos estresados e irritables.

Para la realización del test adaptado se utilizó un contenedor apto para uso alimentario de plástico duro (Politeno) con un tamaño de 63 cm de largo, 43 cm de ancho y 35 cm de alto. El recipiente fue dividido en la mitad de su anchura y longitud mediante una lámina cuadrada de politeno de 2 cm de grosor y 30 cm de longitud,

adherida a una base del mismo material y grueso, de 30 cm de largo por 10 cm de ancho sujeta al fondo del contenedor mediante tornillos de acero inoxidable al fondo del contenedor evitando que se moviera. Para permitir que los animales se escapasen del agua se utilizó una plataforma que consistía en un tubo macizo de nylon blanco de 20 cm de longitud y 10 cm de diámetro con una base cuadrada de polietileno de 10 cm de lado.

Con este test se realizó una tarea de discriminación visual entre dos señales que se encontraban dentro del laberinto siendo fáciles de identificar y visualizar por los animales. Las señales que se utilizaron en el test consistían en dos cartones con fondo blanco con franjas de color negro. Las franjas se diferenciaban por el diámetro de su grosor. Una de las dos señales presentaba franjas el doble de gruesas que la otra. Una vez un animal fue aleatorizado a una de las señales delante de la señal reforzada (+) se colocó la plataforma sumergida 1cm respecto a la superficie del agua. Para evitar que el animal pudiese ver previamente su posición se tiñó el agua de blanco con látex líquido. Delante de la señal no reforzada (-) no había nada. Para que los animales se sintiesen cómodos el test se realizó siempre con temperaturas del agua entre 22 y 25 °C.

Cada una de las señales se localizaba al final de uno de los dos brazos o segmentos en que quedaba dividido el contenedor situándose en el lado opuesto del contenedor y del punto de salida (starting point) de los animales. De una manera semi-aleatorizada la señal reforzada se fue alternando en cada uno de los segmentos siendo siempre la misma para cada animal pero distinta entre cada uno de los animales (Figura 15).

Este test es una adaptación del laberinto acuático diseñado en 1984 por Richard G. Morris (Morris, 1984), siendo un test de comportamiento ampliamente utilizado para poder valorar la memoria temporo-espacial (Camprubí, 2017).

Se realizaron 4 ensayos diarios durante 10 días. Cada animal recibió un refuerzo para una señal concreta. Para ello al inicio se dejó que el animal explorara la piscina un tiempo máximo de 50 segundos. Cuando el animal escogía incorrectamente, se mantenía en el agua en esa zona por un intervalo de tiempo de 50 segundos, luego se le dejaba encima de la plataforma y una vez en esta se le mantenía encima durante 5 segundos antes de sacarlo. Si por el contrario, escogía desde el inicio la opción

correcta, una vez el animal subía a la plataforma, se le mantenía en ella durante 5 segundos y transcurridos éstos se le retiraba y se le secaba.

Posteriormente, se registró el tiempo de latencia (tiempo que tardaban en salir del agua) en cada uno de los cuatro ensayos que se realizaban diarios. Una vez finalizada la fase de tanteo si el animal no alcanzaba la plataforma a los 50 segundos se retiraba del agua.

A los 35 días de vida, los animales fueron pesados y sacrificados.



Figura 15. Laberinto acuático de Morris. Los animales se colocan dentro de un contenedor acuático con látex. Se cronometra el tiempo necesario para que cada animal llegue a la plataforma con la señal correspondiente.

3.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos

- Experimento 1:

Los resultados de los parámetros que seguían una distribución normal se expresaron en media +/- desviación estándar, mientras las variables no paramétricas fueron expresadas en mediana y rango. Para realizar el análisis estadístico de las diferencias entre grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica para la comparación de los valores de proteína S100 β entre los 5 grupos, aceptando $p < 0.05$ como significación estadística.

- Experimento 2:

El análisis de los resultados en Western Blot, fueron expresados como el ratio entre caspasa-3 y su proteína control de carga GAPDH. Posteriormente todos ellos fueron expresados en porcentaje respecto al del grupo control (presentado como diagrama de barras). Se represento en las graficas como media y media \pm error estándar de la media. Los resultados fueron analizados utilizando un test de Kruskal-Wallis, aceptando $p < 0.05$ como significación estadística.

Para la determinación de las diferencias entre sexo se utilizaron las mismas técnicas.

- Experimento 3:

El área de infarto y de hipocampo fueron expresados en media \pm desviación estándar. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó un test de ANOVA, realizándose un análisis pos-hoc posterior con corrección de bonferroni para determinar diferencias inter-grupo. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa un $p < 0.05$.

Para la determinación de las diferencias entre sexo se utilizaron las mismas técnicas.

La valoración de las diferencias en el *score* neuropatológico también se utilizó un test de ANOVA.

- Experimento 4:

Para el análisis de los datos obtenidos en el test de geotaxis negativa se utilizó el test de Kruskal-wallis, aceptando $p < 0.05$ como significación estadística.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las pruebas de aprendizaje se utilizó una prueba ANOVA para dos factores, (tiempo y grupo), con el primero de ellos con medidas repetidas (*two-way ANOVA with repeated measurements*) para cada uno de los tramos independientemente. Se acepto $p < 0,05$ como significación estadística.

Para la determinación de las diferencias entre sexo se utilizaron las mismas técnicas.

Todos los datos fueron analizados con los programas estadísticos STATA 13 y SPSS 17.

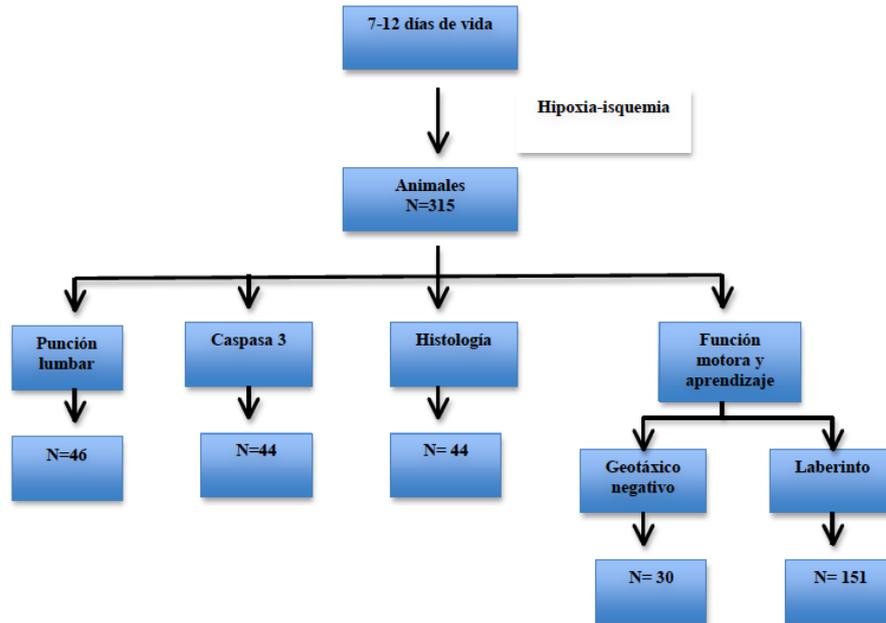
4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Flujo de animales utilizados en los diferentes experimentos

Para valorar el efecto de la terapia neuroprotectora dual (hipotermia más alopurinol), se utilizaron un total de 315 animales. Se distribuyeron en cuatro experimentos:

- Experimento 1: *Punción lumbar*: Extracción de LCR: validación de una técnica de extracción de LCR en crías de rata. (N=46)
- Experimento 2: Valoración de las vías de muerte celular. (N=44)
- Experimento 3: *Valoración del daño histológico*. (N=44)
- Experimento 4: *Evaluación funcional motora y de aprendizaje*.
 - a) Se realizó la valoración a nivel motor mediante el test geotáxico negativo (análisis de reflejos y neurocomportamiento temprano) . (N=30)
 - b) Se realizó la valoración del aprendizaje y la memoria mediante la memoria temporo-espacial. (N=151)



Esquema 1. Flujo de animales utilizados para cada parte del estudio. Se incluyen los animales randomizados antes del evento hipóxico-isquémico.

4.2 Experimento 1: Obtención de líquido cefalorraquídeo

Con el objetivo de obtener LCR para el estudio de biomarcadores o otras moléculas en LCR de cría de rata se validó una nueva técnica para la obtención de LCR.

Se utilizaron un total de 46 crías de rata entre 7 y 12 días. El 54% fueron hembras. La mediana global de peso de los animales utilizados fue de 20.22 g. (14.35-24.65) y el peso del cerebro 0.81g. (0.58-1.07). En la tabla 5 se presentan los resultados en más detalle en función de los días de vida.

El tiempo medio de anestesia para la realización del protocolo fue de 120.39 s (+/- 19.82).

Se obtuvo LCR en el 96% de los casos, con una media de 21.28 µl por individuo (5-40 µl). El volumen más grande se obtuvo en los animales con un mayor peso (p=0.042). A

pesar de ello, la cantidad de LCR no se correlacionó con la edad del animal o con el peso del cerebro ($p>0.05$).

El porcentaje de contaminación hemática de las muestras fue del 4.7%, estas se descartaron para el análisis posterior.

	p7	p8	p9	p10	p11	p12	HIE(p10)
Número animales	10	10	10	14	14	10	5
Peso animal(g)	15.07(13.21-18.3)	15.1(11.57-18)	17.7(13.3-20.16)	18.23(14.83-22.9)	19.8(17.4-21.2)	22.92(21.4-23.5)	19.7 (15.85-23)
Tiempo anestesia (s)	118 (90-150)	137 (128-150)	127 (107-137)	117 (97-124)	111 (102-125)	116 (90-118)	120 (105-133)
Peso cerebro(g)	0.64 (0.58-0.74)	0.69 (0.5-0.79)	0.75 (0.68-0.82)	0.8 (0.72-0.89)	0.94 (0.9-1.04)	1.04 (0.98-1.07)	0.83 (0.8-0.85)
Cantidad LCR (μ l)	15 (0-25)	20 (5-40)	30 (15-40)	25 (0-40)	20 (5-40)	10 (5-40)	25 (15-40)
% Muestras contaminadas	16.6	16.6	0	0	0	0	0
% Exito	80	100	100	90	100	100	100
Valores proteína PS100 β	8.1 (6.9-9)	17 (6.3-19)	10 (7.5-15)	10.2 (4.5-16.3)	8.5 (5-10)	6.4 (4-8.5)	45 (40-50)

Tabla 5. Tabla con las características animales para estudio de PS100 β en LCR. Datos expresados en mediana y rango. Abreviaturas: p= Días de vida. EHI= Encefalopatía hipóxico-isquémica. g= gramos. s= segundos

Los valores de PS100 β en los individuos del grupo control oscilaron entre 5-25 ng/ml, estos no variaron en función del día en el que se realizó la punción lumbar. Tampoco se observó una variación de los niveles de PS100 β dependiendo el tiempo de anestesia.

Los valores de PS100 β en los animales con daño (EHI), fueron superiores a 40 ng/ml. Cuando se compararon estos valores con los obtenidos de las muestras de individuos normales se pudo objetivar una clara diferencia ($p<0.001$) con un valor mucho más alto en los animales con EHI.

La Figura 16 representa la evolución de los valores de normalidad de la PS100 β durante los primeros días de vida.

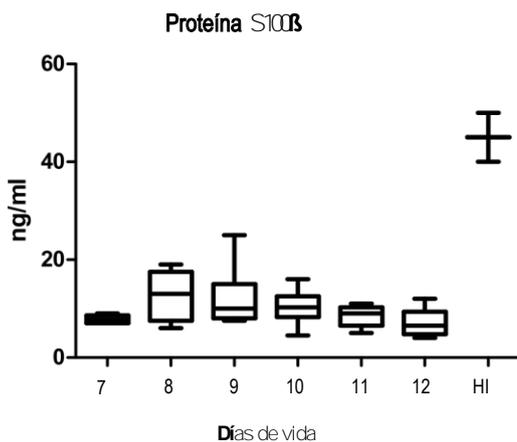


Figura 16. Niveles de PS100β . En la siguiente gráfica se pueden ver la distribución de los valores PS100β desde los 7 días hasta los 12 días en crías de rata sana. HI : Animales de 10 días con daño hipóxico-isquémico. Figura extraída del artículo publicado por los autores **Rodríguez-Fanjul J**, Fernández-Feijóo CD, Camprubí MC. A new technique for collection of cerebrospinal fluid in rat pups J Exp Neurosci. 2015;9:37-41.

4.3 Evaluación de los diferentes tratamientos aplicados después de la agresión hipóxico-isquémica

Los resultados comentados a continuación tienen el objetivo de poder realizar una valoración de global y completa des de múltiples ángulos de los posibles beneficios de las diferentes terapias neuroprotectoras.

Experimento 2: Valoración de la ctividad de la caspasa-3 24 horas después del evento HI

Se utilizaron un total de 44 crías en p10. Se analizó el nivel de caspasa-3 activada a las 24 horas post-evento HI mediante Western blot. Como control interno del procedimiento se utilizó GAPDH. Se realizaron tres experimentos con tres individuos diferentes para cada grupo en cada experimento.

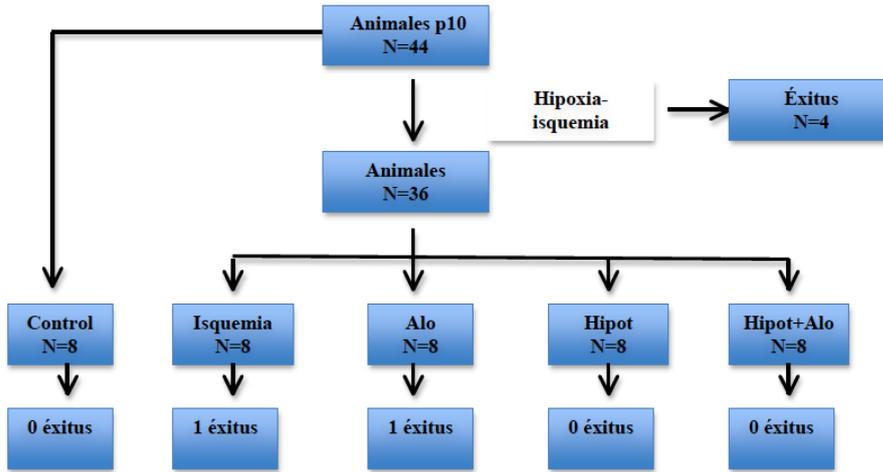
Después de un evento HI el daño cerebral se puede producir por necrosis o apoptosis (Fatemi, 2009). La activación de las caspasas, y en especial la caspasa 3, juega un papel crucial las vías de muerte celular programada caspasa-dependiente. Se ha demostrado que la hipotermia reduce la expresión de la caspasa-3 en modelos EHI en crías de rata (Drury, 2014).

En el análisis del global de animales, los individuos del grupo Isquemia (HI) y Alopurinol (HIA), presentaban valores significativamente más altos que los demás grupos ($p=0.0032$) ($p=0.013$). No se detectaron diferencias entre los grupos que recibieron tratamiento con Hipotermia (HIH), Hipotermia más Alopurinol (HIHA) y el grupo Control.

Se realizó una segunda evaluación separando los animales por sexo. Para ellos se realizaron dos geles diferentes uno con animales machos con la representación de los diferentes grupos y otro con los animales hembra, también con representación de los diferentes grupos. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

En el grupo de machos se objetivaron unos niveles incrementados de caspasa-3 en los grupo HI y HIA cuando se comparaban con el grupo Control ($p=0.0032$). Igual que en el análisis global no hubo diferencias en los niveles de caspasa-3 entre el grupo Control y los otros grupos que recibieron tratamiento neuroprotector (HIH y HIHA).

En las hembras, el grupo que presentó los niveles de caspasa-3 más elevados fue el grupo Isquemia ($p=0.0117$), sin objetivarse diferencias entre el grupo Control y los grupos que recibieron tratamiento: HIA, HIH, HIHA. Todos estos grupos demostraron unos niveles significativamente más bajos de caspasa-3 cuando se compararon con el grupo HI (HIA $p=0.046$, HIH $p=0.025$, HIHA $p=0.025$).



Esquema 2. Clasificación grupos animales utilizados para la medición de los niveles de caspasa. 4 animales fallecieron post-evento hipóxico y antes de la randomización. Uno de los animales del grupo isquemia y otro del grupo alopurinol fallecieron una vez los tratamientos fueron instaurados durante el experimento. Abreviaturas: Alo: Alopurinol. Hipot: Hipotermia. Hipot+Alo: Hipotermia+Alopurinol.

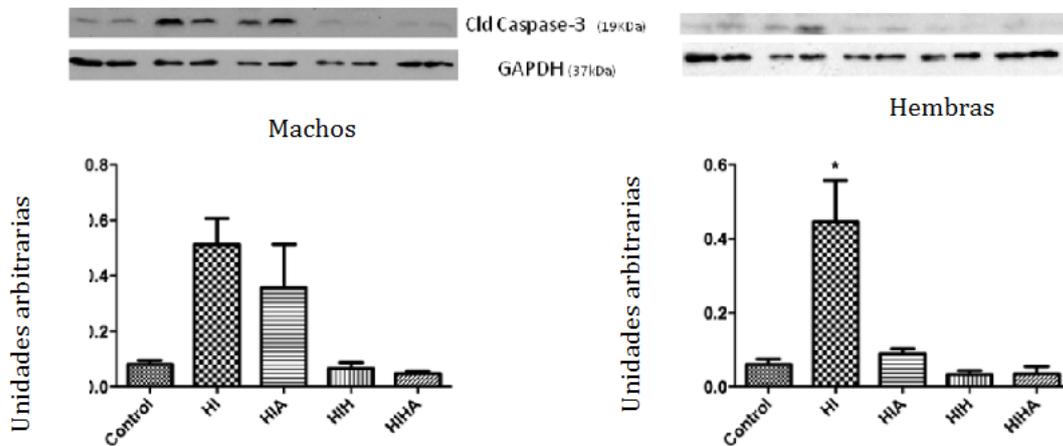
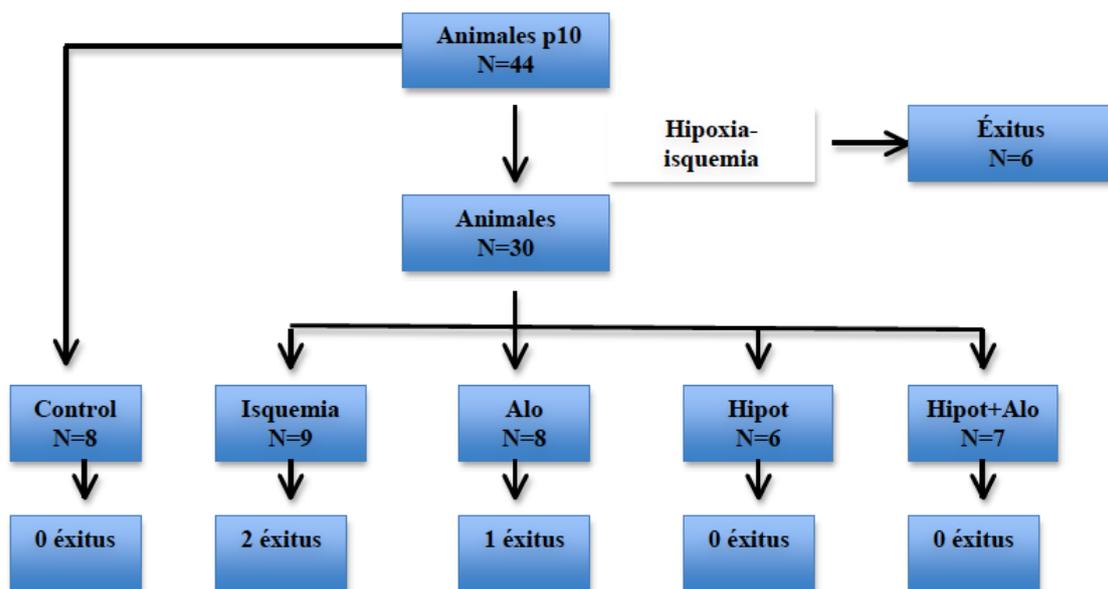


Figura 17. Expresión de caspasa-3. Análisis mediante Western Blot y densitometría de la proteína caspasa-3 en el tejido del hipocampo de machos y hembras de diferentes grupos experimentales. Se utilizó como proteína de carga de control GAPDH. Abreviaturas: HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia hipotermia. HIHA: Hipoxia-isquemia hipotermia alopurinol.

Experimento 3: Valoración daño histológico (Tamaño del infarto, tamaño hipocampo, escore neuropatológico)

La mayoría de trabajos de experimentación animal, utilizan la medición del tamaño de la lesión histológica como una de las estrategias para evaluar los resultados en lo que a neuroprotección se refiere (Sabir, 2016).

Se utilizaron un total de 44 crías en p10.



Esquema 3. Flujo de animales utilizados para la medición del tamaño de la lesión hipóxico-isquémica a las 72 horas. 6 animales fallecieron post-evento hipóxico y antes de la randomización. Dos de los animales del grupo isquemia y uno del grupo alopurinol fallecieron una vez los tratamientos fueron instaurados durante el experimento.

Los grupos de animales fueron homogéneos en a sexo y antropometría .

	Control	Isquemia	Alopurinol	Hipotermia	Hipotermia+Alopurinol	Valor p
N	6	9**	8*	6	7	.76
Sexo (H)	3	4	4	3	4	.72
Peso p10 (g)	18.4 (17.1-19.8)	18.7 (17.6-19.8)	18.1 (16.9-19.3)	18.9 (17.5-19.9)	18.1 (16.3-19.8)	.81
Peso p13 (g)	24.3 (22.5-26.1)	22.9 (21.4-24.4)	23.7 (22.1-25.2)	23.9 (22.7-25.1)	23.8 (22.4-25.2)	.56
Peso cerebro (g)	1.05 (1-1.1)	0.92 (0.86-0.98)	1.01 (0.99-1.03)	1.03 (1.01-1.05)	1.03 (1.01-1.05)	.32

Tabla 6. Características antropométricas animales estudio de daño neuronal histopatológico. Datos expresados en mediana y rango. Abreviaturas. H: hembras; g: (gramos); **Dos de los animales del grupo isquemia falleció post-instauración del tratamiento. * Uno de los animales del grupo alopurinol falleció post-instauración del tratamiento.

Para la valoración del tamaño del infarto y del tamaño del hipocampo se realizó mediante medición manual con el programa *ImageJ* utilizando el método descrito en el apartado “material y método”.

Medición del tamaño del infarto a las a las 72 horas del evento hipóxico-isquémico

En el análisis inicial del global de animales, los individuos del grupo isquemia presentaron una disminución ipsilateral del hipocampo y una pérdida del volumen cortical como consecuencia del infarto. No se objetivaron diferencias macroscópicas entre los grupos Control, HIH y HIHA (Figura 18).

El cerebro de los animales que recibieron tratamiento neuroprotector, presenta un tamaño menor de la zona de infarto (HIA, HIH, HIHA) ($p < 0.0001$). Los individuos del grupo Isquemia presentaban la mayor extensión del área infartada (33.60 % (± 3.30)) en comparación con los del grupo Control 0.37% (± 0.5) ($p < 0.0001$). El tratamiento con HIA y HIH redujo el porcentaje del área a 13.41% (± 3.37) y 5.10% (± 1.04) respectivamente con diferencias estadísticamente significativas. La combinación del tratamiento con HIHA redujo el área del infarto en 3.8 (± 0.99). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos HIH y HIHA.

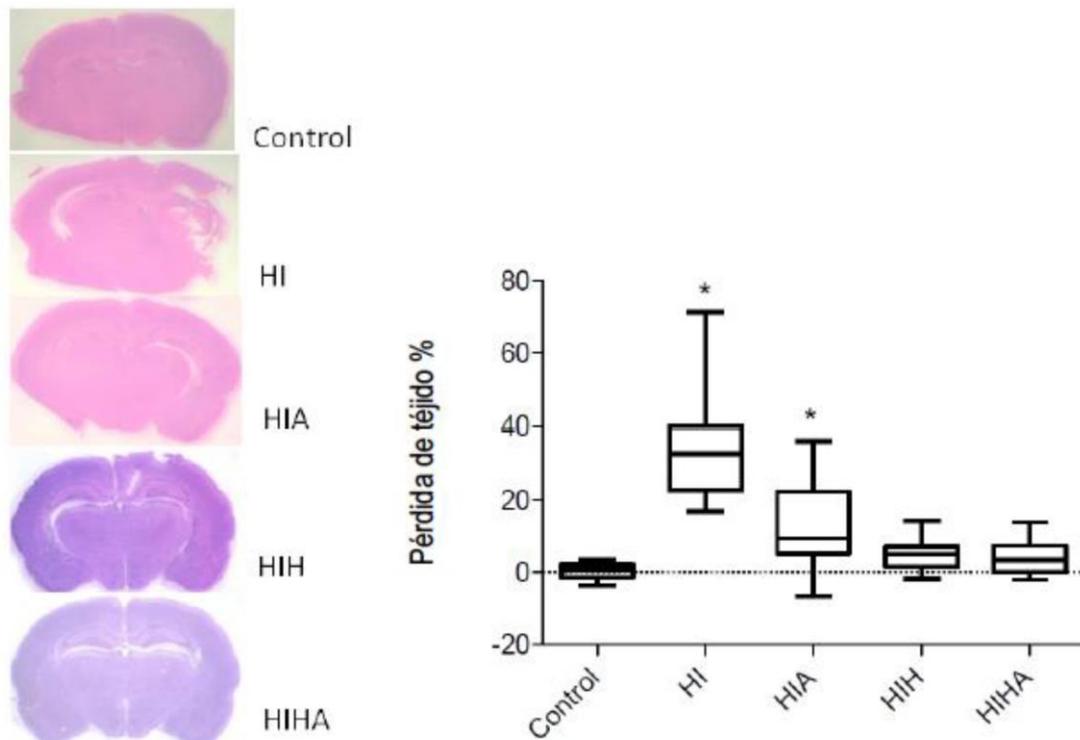


Figura 18. Tamaño infarto hipóxico-isquémico a las 72 horas post-evento HI. a) Cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina entre los diferentes grupos del experimento. B) Gráfica que representa la evaluación cuantitativa del área infartada en cada condición tratada. Acrónimos: HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia+alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia+hipotermia. HIHA: Hipoxia-Isquemia+hipotermia+alopurinol

Se analizó si el global del tamaño del infarto era diferente entre machos y hembras, pero no se encontraron diferencias ($p=0.321$).

Cuando se valoró en el subgrupo de hembras si existían diferencias en función del grupo al que pertenecían se objetivó que el tamaño del infarto era menor en el grupo HIA que en el grupo HI ($p=0.037$). No se objetivaron diferencias en el tamaño del infarto entre los grupos HIA, HIH, HIHA ($p=0.151$; $p=1$; $p=1$).

Cuando se analizó el efecto neuroprotector en los machos, el tamaño del infarto era menor en los grupos HIH y HIHA però no se encontraron diferencias entre el grupo HIA y el grupo HI ($p=0.187$).

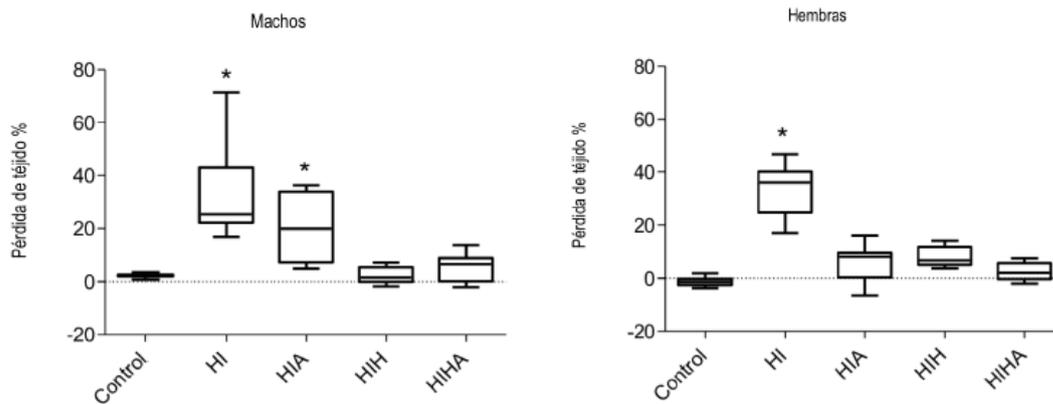


Figura 19. Medición del volumen del hipocampo a las 72 horas del evento hipóxico. Gráfica que representa la evaluación cuantitativa del área infartada en cada condición tratada según los diferentes sexos. Acrónimos: HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia+alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia+hipotermia. HIHA: Hipoxia-Isquemia+hipotermia+alopurinol

Cuando se analizó el área del hipocampo se objetivaron también diferencias entre los grupos que recibieron tratamiento ($p < 0.0001$). Los animales isquémicos que no recibieron tratamiento presentaron un hipocampo más pequeño en comparación de los que habían recibido algún tratamiento neuroprotector con HIH o HIHA ($p=1$). Los animales que recibieron tratamiento con alopurinol preservaban mayor el tamaño del hipocampo que los individuos del grupo isquemia pero sin diferir estadísticamente de ellos.

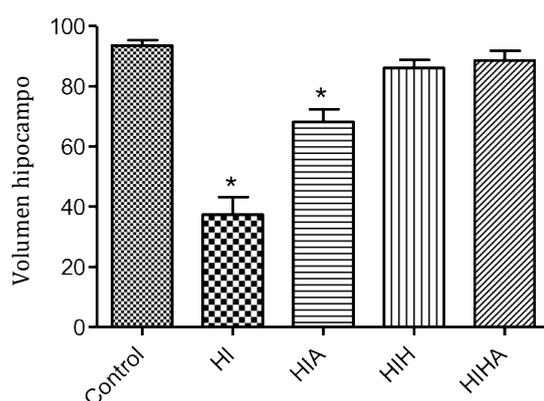


Figura 20. Medición de la evaluación cuantitativa del área preservada hipocampo a las 72 horas del evento hipóxico. Gráfica que representa la evaluación cuantitativa del área de hipocampo preservada según cada condición de tratamiento. Acrónimos HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia+alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia+hipotermia. HIHA: Hipoxia-Isquemia+hipotermia+alopurinol

Cuando se analizó el tamaño del hipocampo según el sexo y condición, en las hembras no se objetivaron diferencias entre los grupos que recibieron tratamiento neuroprotector, incluyendo el grupo HIA, HIH y HIHA ($p=0.398$; $p=1$; $p=1$). En los machos, el tamaño del hipocampo de los animales que recibieron tratamiento con HIA fue similar al del grupo HI, y diferente de los otros ($p=0.003$).

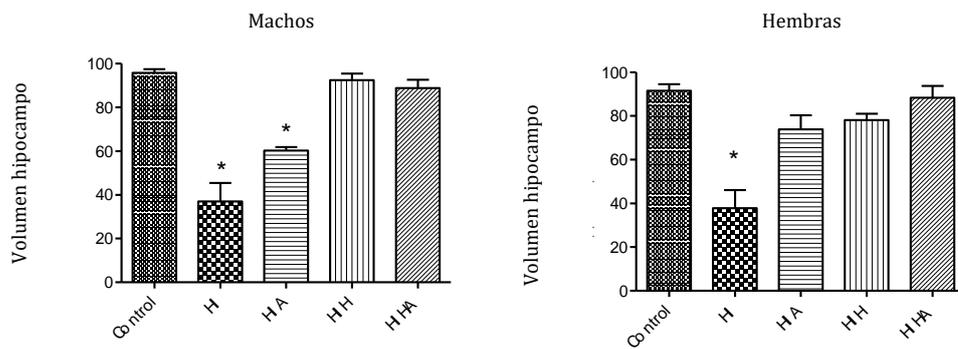


Figura 21. Gráfica que representa la evaluación cuantitativa del área de hipocampo preservada según cada condición de tratamiento y según sexo. Acrónimos HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia+alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia+hipotermia. HIHA: Hipoxia-Isquemia+hipotermia+alopurinol.

Valoración del daño mediante el la graduación (score) neuropatológico

El análisis del *score* neuropatológico fue estadísticamente diferente entre los grupos ($p=0.001$). En el análisis post-hoc, el grupo control ($p=0.001$), HIH ($p=0.001$) y HIHA ($p=0.001$) fueron diferentes del grupo HI y HIA. La estructura histológica se encontraba más preservada en los animales tratados con hipotermia (HIH y HIHA) que en los HI y HIA, en los que el daño histológico era más evidente, con infartos mayores y una mayor superficie afectada.

Se evaluó si existían diferencias en el análisis global del *score* en función del sexo, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se analizó considerando el género. En el grupo de machos, los resultados fueron similares a los del análisis global. Con una diferencia clara entre los grupos ($p=0.0004$). Los grupos control ($p=0.001$), HIH ($p=0.0004$) y HIHA ($p=0.0006$) fueron

diferentes de los diferentes HI y HIA. No se detectaron diferencias entre HI y HIA.

Al analizar las hembras, se objetivaron también diferencias entre los diferentes grupos ($p=0.003$), pero el grupo control ($p=0.02$), HIH ($p=0.036$), HIHA ($p=0.036$), y HIA ($p=0.029$) fueron diferentes del grupo HI. No se objetivaron diferencias entre los grupos HIH y HIHA ($p=0.8039$).

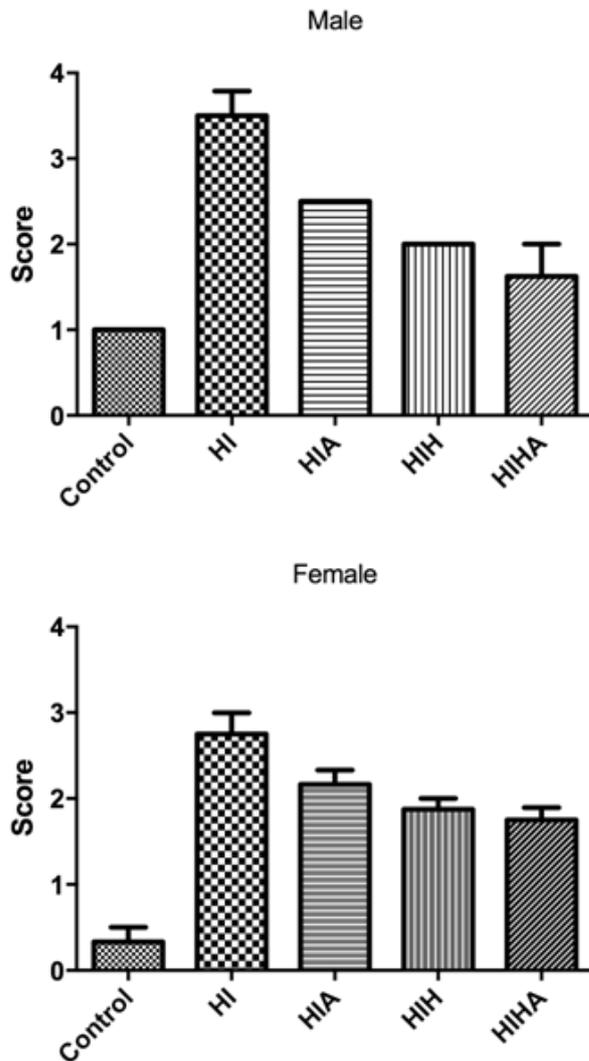
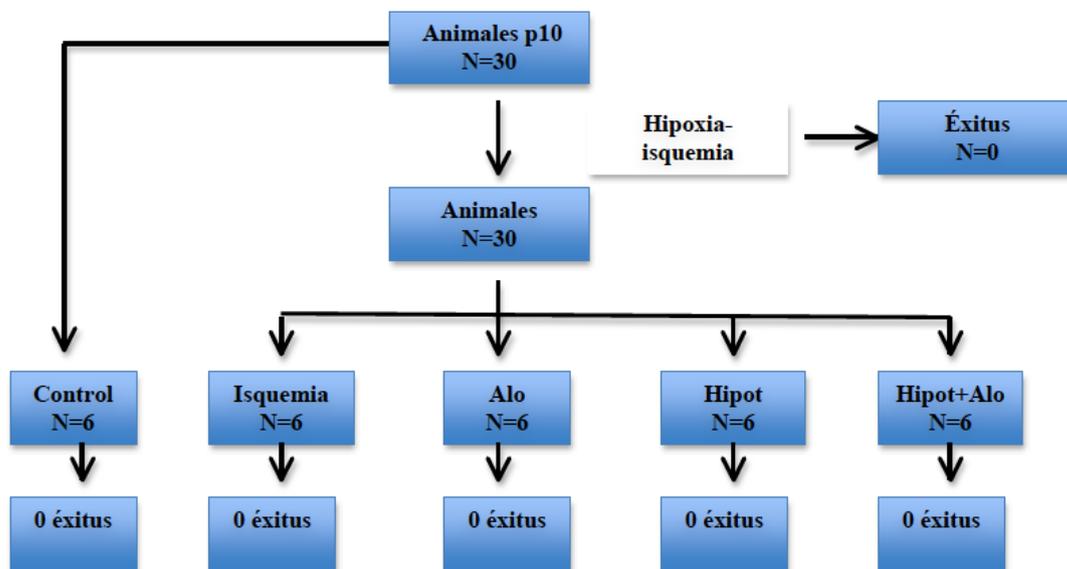


Figura 22. Gráfica que representa la evaluación del escore neuropatológico según cada condición de tratamiento y según sexo . Acrónimos HI: Hipoxia-isquemia. HIA: Hipoxia-isquemia+alopurinol. HIH: Hipoxia-isquemia+hipotermia. HIHA: Hipoxia-Isquemia+hipotermia+alopurinol.

Experimento 4: Evaluación funcional (motora y cognitiva)

Test geotáxico negativo (evaluación motora)

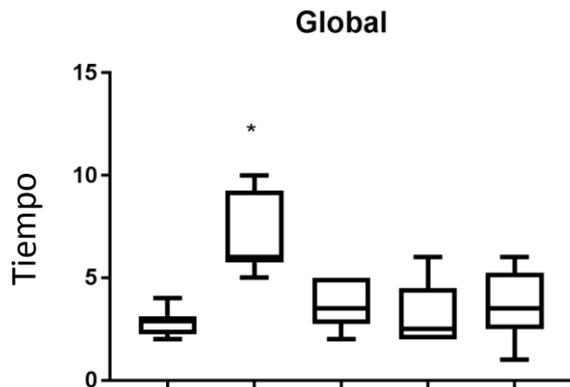
Para valorar el efecto funcional de las diferentes terapias a corto plazo se realizó el test geotáxico negativo. Este test está validado en roedores para el estudio de los reflejos de neurocomportamiento temprano, siendo un buen indicador de la función motora basal de estos animales.



Esquema 4 Clasificación grupos animales utilizados en el test geotáxico negativo. 0 animales fallecieron post-evento hipóxico y antes de la randomización. Abreviaturas: Alo: Alopurinol. Hipot: Hipotermia. Hipot+Alo: Hipotermia+Alopurinol

Los resultados del test geotáxico fueron diferentes entre los grupos ($p=0.002$). Todos los grupos que habían recibido tratamiento presentaron mejores resultados que los animales que no recibieron tratamiento (Figura 23).

Cuando los animales se analizaron según el sexo se objetivaron las mismas diferencias, con todos los grupos tratados presentando mejores resultados que los animales HI, pero no hubo diferencias de acuerdo al género.



nia. A:

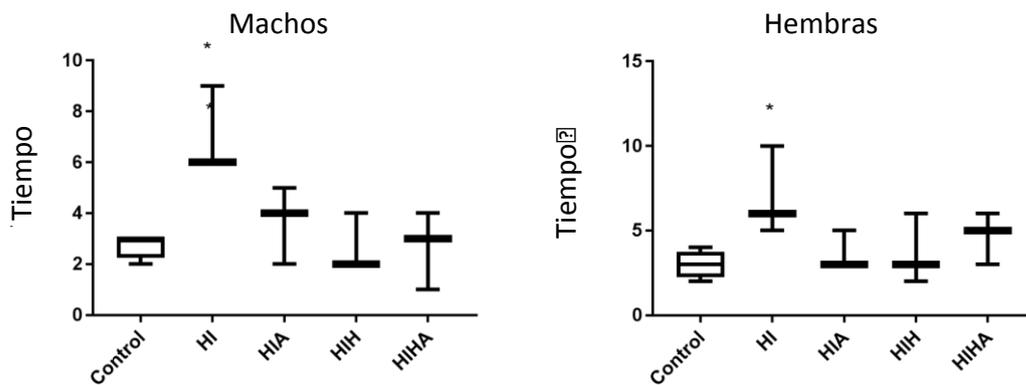
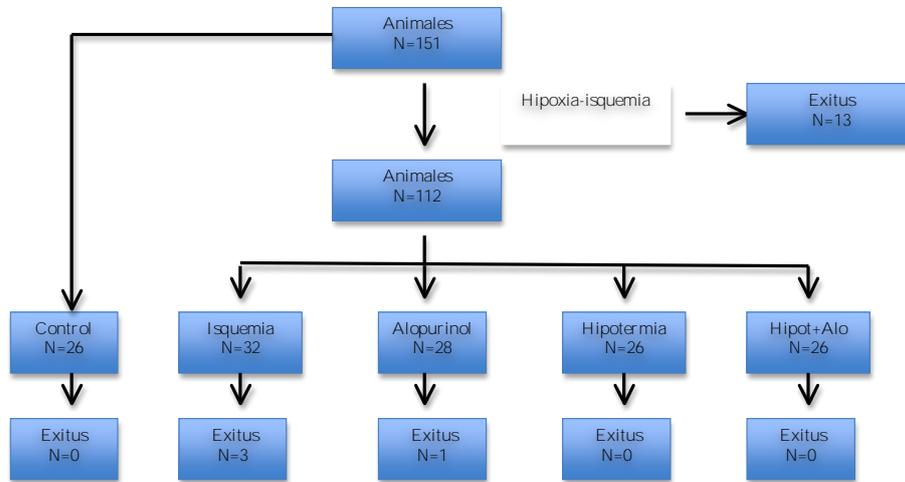


Figura 24, Resultados según sexo test geotáxico negativo. Acrónimos: C: Control D: Daño normotermia. A: Alopurinol H: Hipotermia HIA: Hipotermia+Alopurinol.

Laberinto de Morris adaptado: valoración de la memoria temporo-espacial

Para valorar el efecto neuroprotector de las diferentes terapias a largo plazo, se sometió a los animales a un laberinto acuático de Morris modificado para animales

pequeños. El laberinto acuático de Morris es un test neuropsicológico que se aplica en roedores. Este test evalúa la memoria explícita o hipocampo dependiente.



Esquema 5. Clasificación grupos animales utilizados para el laberinto de Morris. 13 animales fallecieron post-evento hipóxico y antes de la randomización a los tratamientos. 3 animales del grupo isquemia fallecieron una vez instaurado el tratamiento y 1 en el grupo alopurinol.

Todos los animales que sobrevivieron empezaron el entrenamiento a los 25 días de vida (15 días después del episodio HI) y se entrenaron durante 10 días consecutivos. Cada animal realizó el test 4 veces por días. El test se finalizó a los 35 días de vida y los animales fueron sacrificados a los 36 días de vida.

La tabla 7 presenta las características antropométricas de los animales utilizados en esta parte del experimento.

	Control	Isquemia	Alopurinol	Hipotermia	Hipot+Alop	Valor p
N	26	32	28	26	26	ns
Sexo N(H)	13	16	13	14	13	ns
N % Exitus post-H	0	3 (10%)	4(14%)	4(15%)	3(11%)	ns
N % Exitus post-tto	0	3(10%)	1(4%)	0	0	ns
N total laberinto	26	29	27	26	26	ns
Peso p10 (g)	17.26 (14.96-19.56)	17.95 (15.35-20.55)	18.14 (16.04-20.24)	17.75 (14.95-20.55)	17.46 (14.76-20.16)	ns
Peso p25 (g)	62.57 (53.8-71.47)	60 (50.46-69.54)	61.58 (52.54-70.62)	65.6 (53.56-77.64)	62.57 (51.42-75.23)	ns
Peso p35 (g)	118.68 (100.45-136.3)	106.33 (81.61-129.6)	121.02 (98.67-144.37)	119.13 (104.33-130.96)	112.06 (93.45-133.21)	ns
IC	1.37 (1.13-1.59)	1.18 (0.96-1.38)	1.25 (1.08-1.46)	1.29 (1.11-1.43)	1.18 (0.99-1.36)	ns

Tabla 7. Características antropométricas animales del laberinto de Morris. Datos en mediana y rango. Abreviaturas. H: hembras. g: (gramos) peso en gramos. post-H: post-hipoxia. post-tto: post-tratamiento. p10: 10 días de vida. p25 : 25 días de vida. p35: 35 días de vida. IC: Índice de cefalización

Respecto al incremento de peso entre el inicio y el final se objetivaron diferencias significativas entre el peso inicial y final ($p=0.0001$), pero estas no fueron diferentes entre los grupos ($p=0.536$).

Aquellos animales que no recibieron tratamiento neuroprotector presentaron una mayor mortalidad después del evento hipóxico pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Para realizar el analizar la evolución del aprendizaje se utilizó una prueba ANOVA para dos factores con medidas repetidas, (*two-way ANOVA with repeated measurements*) día y grupo. Posteriormente, se compararon las diferencias inter grupo mediante el análisis post-hoc del resultado.

En todos los grupos, a pesar del evento HI, se objetivó un descenso del tiempo de latencia en función del tiempo transcurrido ($p<0.0001$), pero se detectaron diferencias en la forma y tiempo de aprendizaje entre grupos ($p<0.0001$).

En el análisis post-hoc no se detectaron diferencias entre los grupos Control y HIH ($p=0.181$) y Control y HIHA ($p=0.709$). Si se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la forma de aprender de los controles comparados con los HI ($p=0.000$) y controles con HIA ($p=0.002$).

Al comparar el aprendizaje de los animales del grupo isquemia con el resto de grupos podemos ver que su aprendizaje fue diferente a todos los grupos, incluidos a los del grupo HIA ($p=0.007$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la forma de aprender entre los grupos HIH y HIHA. Los animales que no recibieron ningún tratamiento neuroprotector (isquémico) aprendieron más lentos y tuvieron una curva de aprendizaje diferente al de restos de animales. Los animales que fueron tratados con alopurinol exclusivamente aprendieron más rápido que los del grupo HI pero peor que los del grupo Control y los HIH y HIHA. No se detectaron diferencias en el aprendizaje entre los animales del grupo control y los animales que recibieron tratamiento con HIH y HIHA.

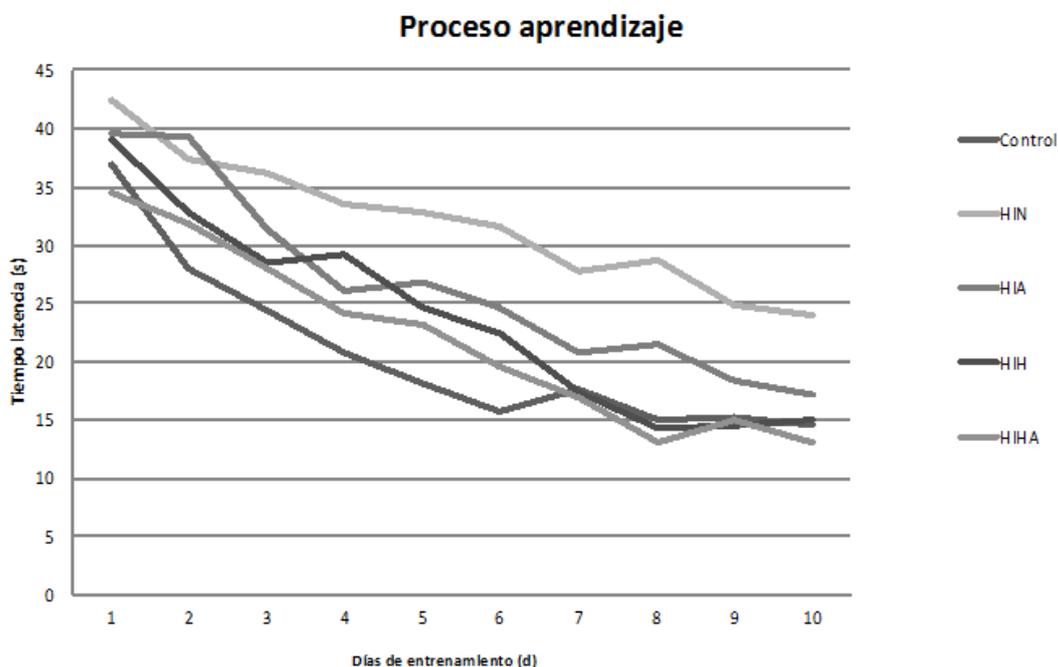


Figura 25 Gráfica de la evolución del aprendizaje en cada uno de los grupos. Se representa la media del tiempo de latencia diario en segundos a lo largo de los días de entrenamiento (1-10 d). Se realizaron 4 ensayos diarios durante 10 días tal como se ha detallado en el apartado de material y métodos.

Cuando se realizan test de inteligencia o de comportamiento en animales casi adultos, siempre se debe tener en consideración el sexo, ya que las diferencias hormonales pueden influir sobre el aprendizaje.

Es por ello que separamos los animales por sexo y se realizó el análisis de nuevo. No se encontraron diferencias entre la forma de aprender machos y hembras en el análisis de ambos grupos ($p=0.965$).

Posteriormente se evaluó la forma de aprender en cada sexo según grupo de tratamiento.

El grupo de las hembras presentó diferencias en el aprendizaje entre el grupo Control y el grupo HI ($p=0.000$) pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los individuos control y los del grupo HIA ($p=0.402$). Tampoco se detectaron diferencias en la forma de aprender entre el grupo Control y los grupo HIH ($p=0.968$) y HIA ($p=1.000$). Los animales del grupo isquémico presentaron una forma de aprender diferente con todos los demás.

En el análisis post-hoc, no se detectaron diferencias entre los animales hembra que habían recibido algún tratamiento neuroprotector.

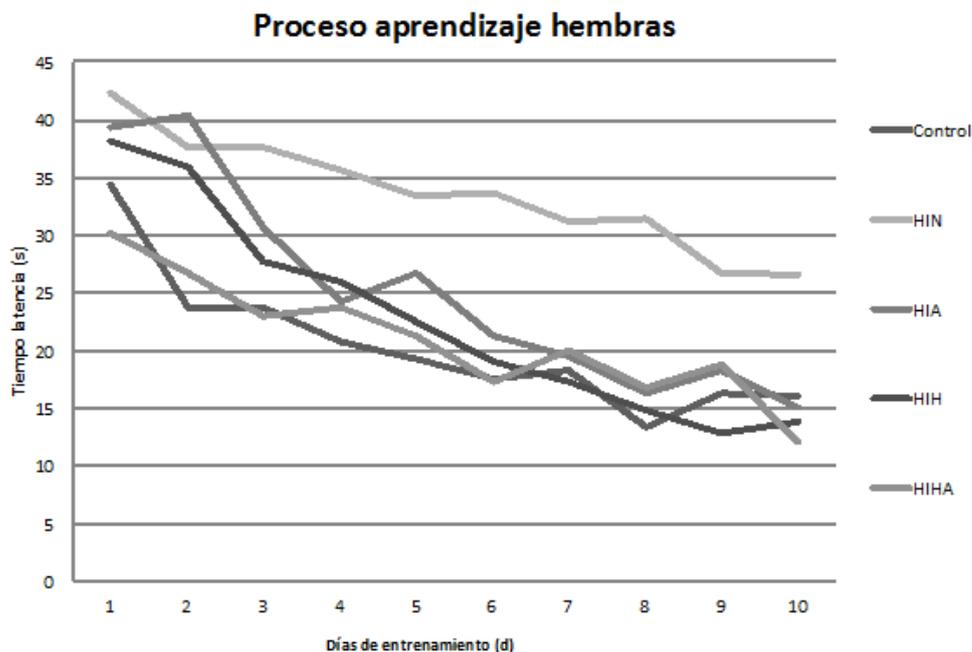


Figura 26. Gráfica con la evolución de los tiempos de aprendizaje de cada uno de los diferentes grupos según el sexo femenino. Se representa la media del tiempo de latencia diario en segundos a lo largo de los días de entrenamiento (1-10).

Cuando se realizó el análisis en el grupo de machos, los resultados obtenidos fueron similares a los del análisis global sin detectarse diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con HIH ($p=0.101$) y HIHA ($p=0.327$). Los animales de los grupos pero grupo HI ($p=0.000$) y HIA ($p=0.003$) aprendieron de forma diferente que los animales del grupo control.

En cuanto al análisis de los grupos que recibieron tratamiento neuroprotector el grupo HIA no presentó diferencias al compararse con el grupo hipotermia ($p=0.76$) y el grupo HIHA ($p=0.26$) pero si respecto el grupo Control ($p=0.003$).

Al analizar el grupo HIH y el grupo HIHA no se encontraron diferencias entre ambos grupos.

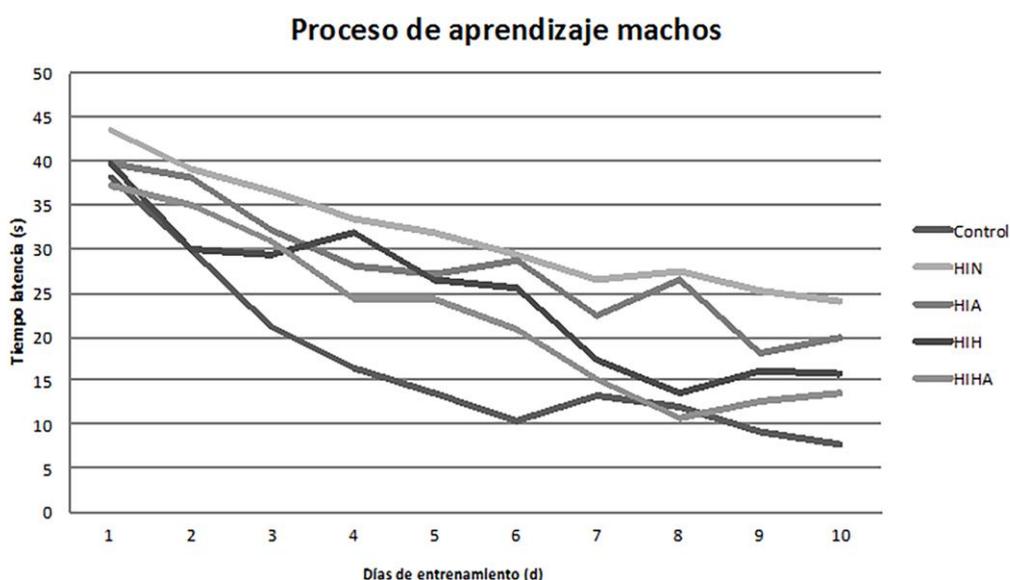


Figura 27. Gráfica con la evolución de los tiempos de aprendizaje de cada uno de los diferentes grupos según el sexo masculino. Se representa la media del tiempo de latencia diario en segundos a lo largo de los días de entrenamiento (1-10).

En resumen, al analizar los resultados por sexo los datos sugieren que el patrón de aprendizaje es similar en machos y hembras en función del grupo al que pertenecen, excepto en el caso las hembras dónde se observa una mejora en los resultados del aprendizaje del grupo alopurinol siendo los resultados similares a los grupo control.

Este efecto neuroprotector no se observa cuando los resultados se analizan en la población general o en el caso de los machos.

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

A/ Discusión del Método

El tratamiento de la EHI ha experimentado un enorme salto en su conocimiento y manejo gracias a la investigación e implementación de la hipotermia terapéutica como tratamiento de la misma (Davidson, 2015). A pesar de ello, existen aún grandes lagunas de conocimiento, que requieren profundizar en su estudio. La investigación sobre nuevas estrategias neuroprotectoras que puedan actuar conjuntamente con la hipotermia, es esencial para mejorar la supervivencia sin secuelas de estos pacientes.

A continuación detallaremos algunos de los aspectos metodológicos que creemos son importantes y hay que tener en cuenta cuando se plantear un trabajo sobre neuroprotección en EHI.

5.1 Modelo animal HI: idoneidad y peculiaridades

Una de las principales ventajas de los trabajos con animales es la posibilidad que ofrecen para probar nuevas terapias y poder valorar mediante histología y marcadores biológicos el efecto de las mismas. Además, gracias a que la mayoría de los animales presentan un crecimiento más rápido que el de los seres humanos, es posible evaluar con mayor facilidad los efectos a largo plazo de las mismas. A pesar de que con estos modelos se han realizado grandes avances y se ha contribuido a profundizar en el conocimiento de la patogenia de muchas entidades, incluyendo la EHI (Mallard, 2015), debemos ser cautelosos en la extrapolación de los resultados al ser humano. Existe una gran heterogeneidad en la severidad de los diferentes modelos de daño en el cerebro en desarrollo (Dobbing, 1979), así como las obvias diferencias interespecie (Gunn,

2015) sin existir todavía un modelo animal capaz de reproducir con exactitud la complejidad del daño HI que presentan los recién nacidos afectados de EHI.

Se han desarrollado diferentes modelos animales de EHI, utilizando diferentes especies, cada una de ellas aportando ventajas en alguna área de estudio como se explicará posteriormente.

La base fundamental en todos los modelos animales creados es generar una situación en la que exista una hipoperfusión, asociada en la mayoría de casos a una hipoxia, a nivel cerebral, para poder mimetizar la situación biológica que ocurre en los cerebros de los recién nacidos cuando sufren un evento HI.

Modelo porcino de EHI

En crías de cerdo el modelo más extendido es el de LeBlanc y colaboradores (Leblanc, 1991) realizado mediante la ligadura reversible de ambas carótidas asociada a una hipotensión secundaria a un sangrado profuso. En estos animales, después de un intervalo de 15 minutos de isquemia a través del clampaje de ambos vasos se induce la hipoxia administrando una concentración de O₂ entre un 0-6% durante un período de 15 minutos. Al finalizar este período, los animales son reoxigenados, las ligaduras carotídeas liberadas y se reinfunde la sangre perdida previamente. Con este modelo se consigue una mortalidad del 30% y entre un 70 y 80% de los animales que sobreviven presentarán algún grado de déficit neurológico (Leblanc, 1993).

Su tamaño, similar al del recién nacido humano, permite monitorizar el electroencefalograma integrado por amplitud (EEGa) o de la monitorización mediante la medición de la saturación regional de oxígeno NIRS (Near-InfraRed Spectroscopy). Con ello se ha podido estratificar, según los patrones de monitorización, el grado de daño que presentan clínicamente estos animales pudiéndose estratificar en leve, moderado o severo (Nakamura, 2013; Nakamura, 2015).

Las principales ventajas e inconvenientes del modelo porcino ser recogidos en la siguiente tabla.

VENTAJAS	INCOVENIENTES
Las crías de cerdo de 3-5 días tienen una maduración cerebral similar / paralela a los recién nacidos a término	La neuromaduración es más rápida que en humanos, la fiabilidad de la edad postnatal es difícil determinar
Permite monitorización de la actividad cerebral con el monitor de función cerebral aEEG	Es el modelo animal de mayor coste económico
Tamaño adecuado para examinar y monitorizar fallo multiorgánico secundario a la hipoxia isquemia	
Estandarización de métodos de evaluación a largo plazo del daño HI tanto a nivel cognitivo como motor	

Tabla 8. Ventajas e inconvenientes del modelo animal porcino de hipoxia-isquemia.

Modelo bovino de EHI

Para la realización de la hipoxia isquemia hay dos modelos descritos, basándose ambos en animales prácticamente a término (119-133 días). En el primero, las crías de oveja son extraídas mediante cesárea y posteriormente se produce la oclusión temporal de las dos arterias carótidas durante 30 minutos (Tann, 1992). En el segundo se procede a la oclusión temporal de las arterias uterinas durante 60 minutos, seguido por la hipoxia materna adicional durante 120 minutos (Hagberg, 1987).

Una de las ventajas de los modelos en crías de cordero, es que gracias a su tamaño, es posible de colocación de un catéter en la vena yugular previo a la instauración del daño hipóxico, pudiéndose medir la saturación venosa mixta en las diferentes fases. Para ello los animales son extraídos del útero cateterizándose la vena yugular y posteriormente vuelven a ser introducidos en él (Mallard, 1993; Tan, 1993). Con este modelo se han obtenido datos muy novedosos, pero al tratarse de animales de gran tamaño, el estudio de las repercusiones a largo plazo es difícil de realizar.

VENTAJAS	INCOVENIENTES
Monitorización de la hemodinámica cerebral mediante la instauración de catéteres yugulares	Dificultad en la correlación de la maduración cerebral (Roohey, 1997)
Monitorización de la actividad cerebral con el monitor de función cerebral aEEG	Modelo técnicamente difícil, caro y laborioso y con un tiempo de gestación largo (4 meses)
Tamaño adecuado para examinar y monitorizar fallo multiorgánico HI	No estandarización de métodos de evaluación a largo plazo del daño hipóxico tanto a nivel cognitivo como motor (Castillo-Melendez, 2013)

Tabla 9. Ventajas e inconvenientes del modelo animal porcino de hipoxia-isquemia.

Modelo en roedor de EHI

El modelo más ampliamente utilizado en la literatura es el de cría de rata (Ricce-Vannuci). Este modelo es una evolución del modelo de daño cerebral publicado por Levine en 1960 con ratas adultas (Levine, 1960). Previo a su publicación, los modelos animales que se utilizaban para la reproducción de daño neuronal utilizaban la inyección de cianida (Hichs, 1950). El principal problema de este modelo es que con el se conseguía un daño neuronal difuso, sin asociarse a una isquemia focal o global que mimetizara el período de hipoperfusión característico de los recién nacidos afectados de EHI.

Unos años más tarde, Levine validó un modelo en el que sometía a ratas adultas a una hipoperfusión cerebral, asociada a una hipoxia, creando así una lesión realmente hipóxico-isquémica. Para ello, se realizaba una ligadura de la carótida derecha con sección de la misma. Este procedimiento se realizaba externamente sin visualización directa ni disección del paquete vascular, por lo que posteriormente la mayoría de los animales presentaba problemas en la apertura palpebral (síndrome de Horner). En la descripción del modelo, la aparición de esta lesión era considerada el reflejo de que el procedimiento era exitoso. Después de la cirugía, los animales se acomodaban en un

ambiente hipóxico (6-10% de O₂) con una mezcla de aire y óxido nitroso hasta que el animal perdía el conocimiento (máximo 40 minutos).

Con este modelo, se conseguía una gran lesión en el hemisferio ipsilateral a la ligadura, que englobaba córtex, cuerpo estriado, tálamo y ya se demostró que la zona con mayor lesión era la del hipocampo. En la descripción histopatológica de las lesiones producidas se evidenciaba una mayor lesión de la sustancia gris que de la sustancia blanca (Rice, 1981). En trabajos más contemporáneos que han utilizado la misma metodología, se ha detectado que también existe lesión en la zona subcortical y en la sustancia blanca periventricular en hasta un 92% de los animales (Vannucci, 2005). La mayoría de autores han optado por regular el tiempo de hipoxia para mejorar la supervivencia y crear modelos con lesiones más moderadas, para poder utilizar modelos más translacionales. La mortalidad dependiendo del grado de hipoxia oscila entre el 20 y 50% observándose zonas cerebrales de infarto en el territorio de la arteria cerebral media (Rice, 1981). Tiempos más cortos de hipoxia se traducen en lesiones a nivel del córtex cerebral y el hipocampo, mientras que tiempos más largos producen lesiones cavitarias en el hemisferio cerebral similares a los quistes porencefálicos que se pueden detectar en el cerebro humano (Towfighi, 1991).

En 1981, Vanucci y colaboradores desarrollaron, a partir del modelo de Levine, el primer modelo para estudiar los efectos de la HI en crías (Vannucci, 1981). El objetivo final era crear un modelo de EHI neonatal. Para ello utilizaron animales de 7 días de vida a los que sometían a una ligadura unilateral de la carótida derecha pero con una correcta disección del paquete vascular evitando el clampaje de la yugular y del nervio recurrente. Después de recuperarse de la cirugía, los animales eran sometidos a una hipoxia (8% oxígeno, 92% óxido nitroso) mientras se mantenían en un ambiente termoestable (temperatura constante de 37°C). El tiempo de hipoxia, al igual que en el modelo de Levine, se ha ido modificando en función del grado de lesión deseable en cada estudio (Sabir, 2012). Se ha documentado, que en estas condiciones ambientales, las crías de rata son capaces de sobrevivir hasta 3 horas (Vannucci, 2005).

Es importante destacar que en todos los modelos de lesión hipóxico-isquémica en crías de rata es necesaria la utilización conjunta de isquemia e hipoxia, ya que en los

trabajos previos, se había descrito que la hipoxia sola no era suficientemente lesiva para poder generar un buen modelo (Rooney, 1997).

Sabir y colaboradores en 2012, propusieron una modificación del modelo de Rice-Vannucci, en el que realizaba la ligadura de la carótida derecha y posteriormente durante 90 minutos sometía a los animales a una situación de hipoxia con una atmósfera al 8% de oxígeno con una temperatura constante de 36 °C. Con esta variación del método, consiguió un daño moderado con una mortalidad inferior a la descrita en otros trabajos, de un 16-20% de los animales y una lesión de hasta el 40% del hemisferio cerebral (Rice, 1981). Así mismo, incrementado el tiempo de hipoxia y la temperatura durante la misma, 120 minutos (8% de oxígeno y 37 °C), se incrementó la mortalidad a un 25-30% y el tamaño de la lesión de hasta el 60% del hemisferio ipsilateral (Vanucci, 2005). También el tiempo sin alimentación, al disminuir los niveles de glucosa, fue sugerido como un factor que podía incrementar el tamaño del infarto (Hattori, 1990).

En la tabla siguiente se listan las ventajas e inconvenientes del modelo animal de EHI en crías de rata.

VENTAJAS	INCOVENIENTES
Se conoce con exactitud la edad equivalente de maduración cerebral	Imposibilidad de medición de variables hemodinámicas a nivel cerebral
Facilidad de reproducción del método y escaso coste del material necesario	El cerebro de las crías de rata es más resistente a los insultos asfícticos que el cerebro de los recién nacidos humanos
Tiempo de gestación corto (21 días) con obtención de entre 5-10 crías por camada	
Se conoce con exactitud como reproducir un daño leve, moderado o grave	
Amplia literatura publicada con estudios sobre valoración neuroquímica, fisiológica y posibilidad de métodos de evaluación a largo plazo a nivel cognitivo y motor	

Tabla 10. Ventajas e inconvenientes del modelo animal en roedor de hipoxia-isquemia.

Al largo de los años, el modelo animal de Rice-Vannuci ha sido ampliamente utilizado en la literatura para estudiar las fases del daño cerebral así como múltiples terapias neuroprotectoras. En la siguiente tabla se listan algunos de los trabajos y se describen las principales características de su metodología. Comparándolos entre ellos ya podemos ver, a simple vista que las características entre unos y otros difieren en muchos puntos:

Autor	Edad ratas	Carótida	Anestesia	Tiempo Recuperación	Hipoxia-isquemia
Levine, 1960	Adultas	Derecha. Doble sutura con ligadura ciega externa	Pentobarbital (EHI a las 24 horas) Ether (EHI mismo día)		O ₂ (?) - N ₂ (?)
Rice, 1981	7 días	Izquierda. Seda 4.0 Doble sutura Sección posterior	Halotano (4% inducción, 1.5% mantenimiento) 30% O ₂ y ON 20 minutos	4-8 horas con sus madres	8% O ₂ -92%N ₂ 210 minutos T 33 °C aire T 37 °C en agua
Palmer, 1993	7 días	Derecha. Seda 4.0	Halotano (4% inducción, 1.5% mantenimiento) 30% O ₂ y NO 5 min	3 horas con sus madres	8% O ₂ -92%N ₂ ;145 minutos T 33-34 °C aire
Ikeda, 2002	7 días	Izquierda. Seda 4.0 Doble sutura. Sección posterior	Ether	1-2 horas con sus madres	8% O ₂ -92% 120 minutos T 33 °C aire
Vanucci , 2004	7 días	Unilateral. No especifica lado	No especifica	No especifica	8% O ₂ -92%N ₂ 180 minutos T 37 °C
Dinglet, 2006	7 días	Izquierda Seda 6.0 Doble sutura .Sección posterior	Halotano (3.5% inducción, 1.5% mantenimiento) O ₂ y ON (1:1)	1 hora con sus madres	8% O ₂ -92%N ₂ 90 minutos
Lasarzik, 2009	56 días	Doble oclusión carótidas clip	Sevoflurano T 37,5 °C Intubadas 3.5% sevoflurano+oxígeno+sufentanil e.v. 2,5 ug/kg/h	30 minutos con sus madres	Oclusión carótidas
Gonzalez-Rodriguez, 2014	10 días	Derecha	Isoflurano 2%	1 hora de recuperación	8% O ₂ -92%N ₂ 120 minutos
Yuan, 2014	10 días	Izquierda	Isoflurano 4%	2 horas con sus madres	8% O ₂ -92%N ₂ 120 minutos T 37 °C alrededor

Tabla 11. Tabla que muestra con los diferentes métodos descritos para la realización del daño hipóxico-isquémico. EHI : Encefalopatía Hipóxico-Isquémica.

Así mismo, tal y como se ha apuntado, es importante constatar que el daño establecido no sólo depende de la cirugía y el día de la misma sino también de la duración de la hipoxia, la altitud en la que se realiza el experimento, así como la temperatura a la que se encuentran los animales en el momento del establecimiento de la lesión. En la siguiente tabla presentamos la variación de la mortalidad y del tipo de daño cerebral en función de la duración y el grado de hipoxia.

Estudio	Tipo de daño	Duración y grado hipoxia	Temperatura	Mortalidad
Osredkar, 2014	Leve	50 minutos/8%	36 C °	10.1%
Sabir, 2012	Moderado	90 minutos/8%	36 C °	16.1%
Sabir, 2014	Moderado	90 minutos/8%	36 C °	15.5%
Sabir, 2012	Severo	150 minutos/8%	37 C °	28%
Lee, 2010	Severo	120 minutos/8%	36 C °	16.5%
Palmer, 1993	Severo	120 minutos/8%	36 C °	41%

Tabla 12. Tabla con los diferentes grados de daño dependiendo del grado de hipoxia sometidos a los animales. La intensidad del insulto es la propia definida por los autores del trabajo.

Por lo tanto, por todo lo que se ha expuesto anteriormente, el modelo animal de EHI en crías de rata es una herramienta excelente para poder estudiar en profundidad los mecanismo y bases biológicas del daño cerebral así como para valorar posibles estrategias neuroprotectoras todo ello sustentado por una amplia bibliografía (Lee, 2010).

Con las crías de rata se puede hacer una evaluación no solo histológica y bioquímica sino también a nivel motor y cognitivo, cosa mucho más difícil si se utilizan otro tipo de modelos. La principal desventaja es la valoración clínica en el momento agudo, ya que al ser animales tan pequeños no es posible hacer una neuromonitorización como se puede realizar en el modelo de cerdo o incluso en el de cordero.

En nuestro trabajo la utilización del modelo animal en crías de rata nos ha permitido evaluar el tratamiento neuroprotector estudiado desde diferentes puntos de vista, desde los niveles más básicos bioquímico e histológico hasta la evaluación de las funciones motoras y de la memoria temporo-espacial. A partir de la revisión de los datos de la literatura y con el objetivo de reproducir un modelo válido y comparable a recién nacidos a término, con un grado moderado-severo de EHI, nuestro grupo escogió someter a los animales a un ambiente hipóxico al 8% durante 90 minutos a 36.5 °C (Sabir, 2012).

Previamente en un trabajo piloto, habíamos sometido a un subgrupo de animales a un ambiente hipóxico al 8% durante 120 minutos a 37 °C. Con él se obtuvieron crías que presentaban un daño “grave”, con una mortalidad del 35% y amplias lesiones quísticas, casi completas del hemisferio cerebral afecto (Figura 28).



Figura 28. Infarto macroscópico a los 35 días de vida en rata que fue sometida a hipoxia al 8% durante 120 minutos a 37 °C. Se puede objetivar zona quística que engloba prácticamente todo el hemisferio dañado.

5.2 Modelo animal y hipotermia

La hipotermia moderada sostenida ha demostrado disminuir la lesión cerebral en modelos animales de EHI de cría de rata (Williams, 1997; Sabir, 2012), incluso llegando a poder ofrecer, según algunos autores, una protección total (Barone, 1997).

Siempre hablando de modelos animales, al igual que ocurre con en el grado de lesión HI conseguida, existe también en el tratamiento con hipotermia una gran disparidad en la metodología utilizada en los diferentes trabajos. Hay discrepancia en la *duración óptima de la terapia*, el *grado de hipotermia* al que se deben mantener los individuos y en otros detalles como el *momento de instauración* de la misma y el *efecto de la terapia en función del grado* de EHI.

En lo que al *tiempo de aplicación* se refiere, existen trabajos en los que la duración del tratamiento va des de un mínimo de 3 horas (Trescher, 1997) hasta otros que lo aplican durante 48 horas (Lee, 2010). La mayoría de autores parece llegar a un consenso sugiriendo que la duración óptima de la terapia en modelos que utilizan roedores, está en unas 5 horas (Sabir, 2012).

En cuanto al *grado de hipotermia* también existe controversia, presentado resultados similares los animales tratados a 30 °C (Lee, 2010) y los que recibieron tratamiento a 33 °C (Sabir, 2012).

Por el contrario también existen trabajos que no encontraron mejoría en los animales tratados con hipotermia. Fang y colaboradores no encontraron una mejoría, a pesar de que el tratamiento instaurado fue de 32 °C durante 8 horas. Estos autores, trabajaban con un modelo de daño severo (120 minutos al 8% de O₂ a 37 °C) (Fang, 2013). Lo mismo describió el grupo de Sabir, evidenciando sólo la eficacia de la hipotermia en los casos en los que el insulto era moderado (90 minutos, 8% O₂) pero no encontrando mejoría en aquellos en los que el insulto era severo (150 minutos, 8% O₂) (Sabir, 2012).

En la tabla 13 presentamos una relación de los principales trabajos que han utilizado la hipotermia como estrategia neuroprotectora en un modelo de rata de EHI.

Con todos estos datos, nuestro grupo decidió utilizar un modelo de HI con daño moderado, en el que a los animales de los grupo hipotermia o hipotermia + alopurinol se les aplicó una el tratamiento con hipotermia a 33 °C durante 5 horas, obteniendo resultados similares a los que otros autores habían descrito (Sabir, 2012).

Autor	Edad ratas	Tiempo de Hipoxia- isquemia	Grado HT y duración	Evaluación histológica	Resultado
Thoresen, 1996	7 d	120 m, 8% O2 a 36.5 °C	32.5 °C 3 h 38.5 °C 8 h	Evaluación córtex, tálamo, ganglios de la base y hipocampo	Menor afectación histológica en hipocampo en HT vs NT y en el resto de áreas sobretodo en el córtex
Trescher, 1997	7	75 m, 8% O2 a 36.5 °C	32 °C 3 h 33 °C 3 h 38°C 3 h	Evaluación córtex cerebral posterior, núcleo anterior estriado y parte dorsal hipocampo	Menor afectación histológica en HT vs NT
Bona, 1998	7 d	70 m 8% O2 a 37 °C	32 °C 6 h 37 °C 6 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en HT (34%) vs NT (53%)
Lee, 2010	7 d	150 m, 8% O2 a 36 °C	30 °C 24/48 h 33 °C 24/48 h 36°C 24 h	Evaluación de daño hemisférico global	Mayor volumen cerebral en las ratas HT (57.11%) vs NT (40.2%). No diferencias entre los diferentes grupos HT.
Fan, 2012	7 d	90 m, 8% O2 a 37 °C	32.5 °C 3 h 37 °C 3 h	Evaluación de daño hemisférico global e hipocampo	Menor afectación en hembras HT (55%) vs NT(75%) pero no en machos HT
Sabir, 2012	7 d	90 m 8% O2 a 37 °C	32.5 °C 5 h 37 °C 5 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en HT (24.8%) vs NT (39%)
Sabir, 2012	7 d	150 m 8% O2 a 37 °C	32.5 °C 5 h 37 °C 5 h	Evaluación de daño hemisférico global	No diferencia de afectación en HT (56.8%)vs NT (57%)
Fang, 2013	7 d	120 m, 8% O2 a 37 °C	32 °C 8 h 37 °C 8 h	Evaluación de córtex parietal, putamen, hipocampo, tálamo	No diferencias estadísticamente significativas
Patel, 2015	10 d	60 m 8% O2 a 36.5 °C	32 °C 4 h 37 °C 4 h	Evaluación de daño hemisférico global	Menor afectación en neocórtex y tálamo pero no en hipocampo en los animales con daño moderado-grave grupo HT vs NT. No diferencias en animales con daño leve

Tabla 13. Tabla que muestra los principales estudios realizados en crías de rata según modelo Rice-Vanuci para evaluar tratamiento con hipotermia y valoración en la histología publicados hasta la fecha Acrónimos tabla. HT: Hipotermia. NT: Normotemia.

5.3 Modelo animal y edad gestacional. Diferencias en el tipo de lesión. Importancia de la edad gestacional en la elección del modelo

El daño hipóxico isquémico afecta al cerebro de forma diferente en función del grado de madurez del mismo. Esto pasa en todas las edades de la vida, pero tiene especial importancia en aquellos cerebros que están en etapas de formación.

En los recién nacidos prematuros, las lesiones cerebrales causadas por la HI afectan principalmente a la sustancia blanca y su formación (Volpe, 2009), siendo la forma más grave de presentación la leucomalacia periventricular.

La lesión HI de la sustancia blanca se produce por la vulnerabilidad de los progenitores de los oligodendrocitos, la pérdida de las neuronas germinales y del tálamo, la no formación de conexiones talamo-corticales y la debilidad de la matriz germinal (Volpe, 2009; Kapellou, 2006). Durante un episodio HI, se produce una sobre estimulación de los receptores NMDA y una liberación masiva de radicales libres, que el SNC inmaduro no es capaz de tamponar (Back, 2001; Huang, 2009). Todo ello contribuirá a la interrupción en el proceso de mielinización, alterando la génesis de los oligodendrocitos, que son las células encargadas de la producción de mielina necesaria para la transmisión de los impulsos nerviosos (Figura 29) (Dean, 2011).

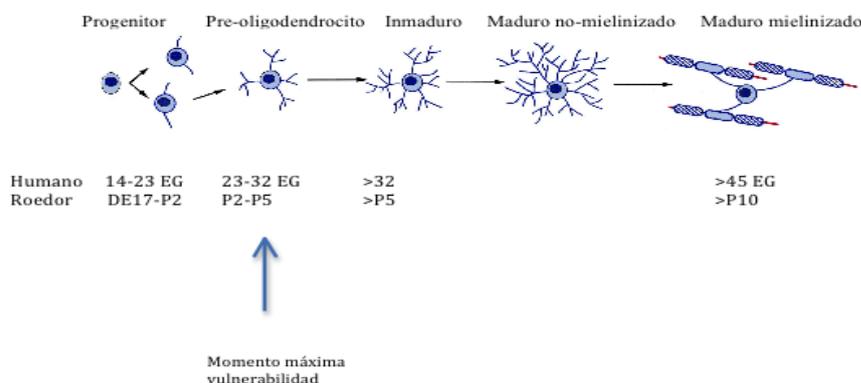


Figura 29. Comparación de los diferentes momentos de desarrollo de los oligodendrocitos entre humanos y roedores. El momento de mayor vulnerabilidad para hipoxia/isquemia es durante la etapa de desarrollo pre-oligodendrocito. Acrónimos: EG: Semanas edad gestacional. DE: Días de embrión. P: Días de vida (Figura modificada de Clowry, 2015).

En los recién nacidos a término, el patrón de lesión secundario a la HI aguda suele ser diferente. En ellos, son típicas las lesiones focales y la afectación primordialmente de regiones de sustancia gris, como el tálamo, el núcleo estriado y el córtex (Volpe, 2012). En casos de HI mantenida, puede existir un patrón de daño cortico-subcortical.

Es importante entender esta diferencia en la maduración cerebral para poder comprender porque existe una susceptibilidad celular y regional diferente según el momento en el que se produzca la lesión HI.

Algunas especies animales nacen en condiciones de “prematuridad” (Workman, 2013). Un ejemplo sería en el caso de los roedores, donde la proliferación de oligodendrocitos, la migración, la diferenciación y la mielinización ocurren durante entre la parte final del embarazo y las dos primeras semanas de vida (Robinson, 2005), alcanzando su pico aproximadamente a los 20 días de vida, cuando los oligodendrocitos maduros con mielina son ya detectables (Wiggins, 1986). En el caso de los seres humanos, los oligodendrocitos aparecen en formas inmaduras durante el tercer trimestre del embarazo y durante el período neonatal, no alcanzando una mielinización más madura hasta los 2-3 años (Back, 2001). Es necesario por lo tanto, que el modelo animal de HI utilizado mimetice el tipo de lesión neuronal y la edad gestacional que queremos estudiar y tratar para poder posteriormente extrapolar los resultados de una forma más concreta (Jantzie, 2015; Gunn, 2015).

El cerebro de las crías de rata a los 7 días presenta unas características biológicas similares a las del cerebro de un pretérmino de 32-34 semanas de edad gestacional: el córtex cerebral está completo, la matriz germinal esta involucionando y a nivel de la sustancia blanca se ha iniciado la mielinización (Vannucci, 2005). En las crías de rata, los pre-oligodendrocitos son predominantes en el cuerpo calloso y en el córtex entre el período de P2 y P5, mientras que los oligodendrocitos empiezan a estar presentes a partir de P7 (Schereyer, 1982; Clowry, 2014). Por lo tanto en el caso de querer mimetizar una lesión neurológica similar a la que presentaría un prematuro moderado esta sería la edad animal ideal (Figura 30).

Curiosamente, la mayoría de estudios realizados con el modelo de Ricce Vannuci para valorar algunas de las principales terapias neuroprotectoras han utilizado crías de 7 días (P7) (Tang, 2016; Goren, 2017). Este punto, que pudiera parecer poco importante, hace que los resultados de muchos de estos trabajos, sean difíciles de extrapolar al humano, ya que las terapias neuroprotectoras utilizadas, especialmente la hipotermia, se han validado básicamente para recién nacidos a término (Rao, 2017; Shankaran, 2017).

No es hasta los p10-P11 que estos cerebros evolucionan histológicamente y presentan características madurativas equivalentes a las de un recién nacido a término (Vanucci, 1999). En crías de rata de p10-p11 destaca la especial vulnerabilidad en la región del hipocampo en comparación con aquellas de p7 (Towfih, 1997; Patel, 2015). Todas ello hace que estas edades mimetizen mejor las características de un cerebro de un recién nacido a término.

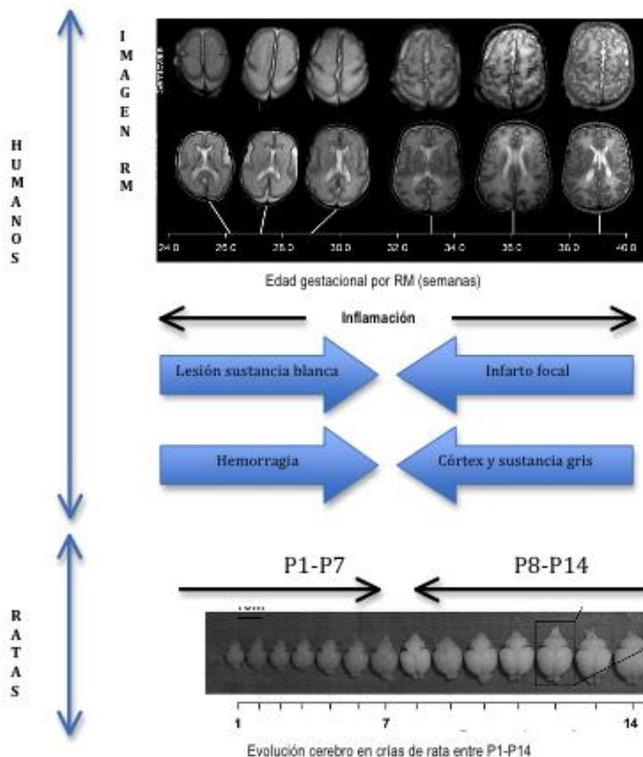


Figura 30. Comparación de las diferentes etapas de desarrollo cerebral de los entre humanos y roedores Se puede observar como la lesión neuronal característica de la prematuridad que en los neonatos humanos ocurre hasta las 32 semanas en crías de rata equivale en las menores de P7 y como la lesión neuronal HI de los recién nacido a término humanos equivale en la rata a P10. Acrónimos tabla P: Días de vida (Figura anatomía cerebros rata extraída de Tucker, 2009)

Existe así evidencia suficiente para justificar que los trabajos orientados a valorar terapias neuroprotectoras para recién nacidos a término afectados de una EHI deberían realizarse en crías de rata de p10-p11 (Patel, 2015; Huang, 2015).

A nuestro conocimiento, existe solo un estudio hasta la fecha que haya valorado el tratamiento con hipotermia en crías de rata P10 (Patel, 2015). En ese trabajo los animales fueron sometidos a un insulto menos severo que en los animales de nuestro trabajo, siendo sometidos a un ambiente hipóxico de 60 minutos al 8% de O₂ comparado con los 90 minutos al 8% O₂ del nuestro. Tal como se ha comentado en el apartado de la introducción se podría argumentar que el insulto producido en el grupo de Patel sería considerado leve y no moderado-grave, por los tiempos y el grado de hipoxia, pero dado que en el estudio no se dan cifras de mortalidad post-HI es difícil de definir.

En nuestro trabajo trabajamos con crías de entre p10-p11, por los argumentos anteriormente discutidos.

5.4 Valoración de la lesión cerebral a nivel histológico en los modelos de EHI

Una de las principales herramientas utilizadas para la valoración del daño cerebral en los trabajos con modelos animales es la estimación del daño histológico. Esta se puede realizar de diferentes formas, desde la valoración del tamaño de la lesión hasta la evaluación de las características histopatológicas de las células. Este ha sido uno de los puntos controvertidos y que implican dificultad a la hora de comparar las terapias estudiadas, porque no existe un protocolo homogéneo de valoración.

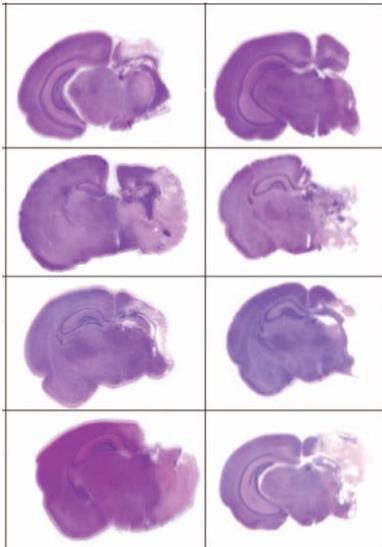


Figura 31. Imágenes de daño histológico. En los diferentes cortes histológicos en hematoxilina-eosina del grado de lesión cerebral producidas en una reproducción del modelo de Rice-Vanucci se puede ver lesión tanto de la corteza como de la sustancia blanca, ganglios de la base y hipocampo con un grado de lesión promedio entre el 60-65%. Imagen seleccionada del artículo publicado por Sabir en 2012.

La mayoría de autores definen el grado de lesión en términos de mortalidad o tamaño de infarto (% de área infartada en el hemisferio isquémico) (Lee, 2010; Sabir, 2012). A pesar de ello, no existe un sistema universal que unifique como realizar la medición y que facilite la comparación entre los diferentes trabajos (Lee, 2010; Wang, 2010; Fan, 2012; Liu, 2015). Algunos autores han utilizado la medición manual de ambos hemisferios realizada a la vez por varios investigadores para evitar la variabilidad inter-observador (Wang, 2010). También se ha descrito la utilización de programas automáticos (Lee, 2010; Fan, 2012; Fang, 2012; Sabir, 2014; Liu, 2015). El método más utilizado para cuantificar el área dañada es el que se realiza de forma automática mediante algún programa de imagen informático y que sigue la fórmula :

$$1 \pm \left(\frac{\text{Area Ratio (hemisférico residual ipsilateral / volumen hemisférico intacto contralateral)}}{\text{volumen hemisférico intacto contralateral}} \right)$$

Esta también fue la medición por con la cual nosotros trabajamos. Esta fórmula se aplicó o solo a nivel del área de infarto sino también cuando se evaluó el tamaño del hipocampo.

A parte de la medición cuantitativa del tamaño del infarto se han creado diferentes escalas (*scores*) para la estratificación del daño cerebral a nivel histológico. Una de las

más utilizadas es la validada por el grupo de Thoresen (Thoresen 1996) aplicada en varios trabajos para evaluar la neuroprotección (Bona, 1998; Sabir, 2012; Sabir, 2014; Liu, 2015). Su amplia aceptación y la baja dificultad de realización han hecho de ella una de las escalas más utilizadas en numerosos estudios sobre neuroprotección en EHI en crías de rata. En esta escala se asigna una puntuación dependiendo del grado de lesión entre 0 y 4 haciendo un sumatorio total de las áreas dañadas. Nuestro grupo también optó por su utilización, por ser una escala (*score*) fácil, rápida y homogénea con otros trabajos.

5.5 Valoración de la lesión cerebral a nivel molecular en los modelos de EHI

Para poder valorar el grado de lesión y cuantificar la eficacia de las diferentes terapias neuroprotectoras, a parte de las valoraciones histológicas ya descritas (tamaño del infarto y el *neuropathological score* de Thoresen) se han utilizado otros marcadores biológicos (Teo, 2015; Jantzie, 2015), siendo uno de los más utilizados en la literatura la determinación de los niveles de caspasa-3 activada (Askalan, 2015; Ni, 2016; Li, 2017).

Mientras que la necrosis ocurre en la fase aguda de la HI y se caracteriza por la pérdida de integridad de la membrana, la inflamación y la lisis de la neurona; la apoptosis, por el contrario, viene precedida por la activación de una cascada molecular que conduce a lo que se conoce como muerte celular programada (Chandra, 2000). Existen diversas familias de proteínas implicadas en la apoptosis, entre ellas las caspasas. Las caspasas son cisteína proteasas específicas provenientes del ácido aspártico, presentan una cisteína en su sitio activo y son capaces de producir una proteólisis de sus sustratos. Todas las caspasas son sintetizadas como zimógenos o pro-enzimas, pudiendo escindirse y activarse en cascada, a otras caspasas ante un determinado “trigger”. Las caspasas se clasifican en varios grupos:

- Iniciadoras o reguladoras (caspasas 2, 8, 9), encargadas de activar a las caspasas efectoras. Presentan un largo prodominio capaz de interactuar con otras proteínas mensajeras. Una misma caspasa iniciadora puede activar a diversas caspasas efectoras.

- Efectoras (Caspasas -3, -6 y -7). Estas actúan sobre enzimas encargadas de la reparación del ADN y sobre proteínas estructurales como las de la lámina nuclear o la actina degradándolas. A diferencia de las caspasas reguladoras presentan un predominio corto.
- Existe un tercer grupo de caspasas que actúa mediando las reacciones inflamatorias, como por ejemplo la caspasa-1, también conocida como la interleuquina 1- β (Stennicke, 2002).

La caspasa-3 es la caspasa más abundante en el cerebro y parece jugar un papel crucial tanto en el desarrollo normal del cerebro como en situaciones de daño cerebral (Wang, 2001). Su implicación en la activación de la muerte celular programada después de un evento HI ha sido ampliamente descrita (Chen, 1998; Li, 2010). Es por ello que se ha sido muy utilizada como marcador del grado de apoptosis en trabajos que valoran la efectividad de las terapias neuroprotectoras (Lafuente, 2016; Posod, 2017).

Después de un evento HI, los niveles de caspasa-3 presentan un pico de máxima expresión hacia las 24 horas, con una disminución posterior a sus niveles basales antes de las 48 horas post-evento HI (Wang, 2001). El tratamiento con hipotermia, así como el efecto de otras terapias neuroprotectoras, han demostrado reducir la expresión de los niveles de caspasa-3 en crías de rata (Adachi, 2001; Tang, 2017).

En nuestro trabajo utilizamos la caspasa-3 activada como marcadores de apoptosis para realizar una valoración del daño a nivel molecular a las 24h del evento.

5.6 Evaluación funcional. Test motores y de aprendizaje y memoria

Los niños que sobreviven a una EHI, pueden presentar en un número no despreciable secuelas a largo plazo, ya sean motoras o cognitivas (alteraciones en el aprendizaje y la memoria) (Fotopoulos, 2001; Van Handel, 2007).

Cuando se utiliza un modelo animal, para poder valorar correctamente la eficacia de alguna terapia sobre la funcionalidad existen diferentes test. Es importante tener en cuenta que dependiendo del sexo los animales pueden tener una predisposición a obtener mejores o peores resultados en algunos test tal como resumimos en la figura 32.

El test geotáxico negativo es un test senso-motor que sirve para evaluar la capacidad funcional a corto plazo. Consiste en la respuesta a la orientación y al movimiento en contra de un vector gravitacional. Para la realización del test se coloca a la cría de rata en un plano inclinado de 25 grados con la cabeza orientada boca abajo. Se analiza el tiempo necesario para que el animal rote 180° y se desplace hasta el final de la superficie. Tal como se ha mostrado en nuestros resultados las habilidades motoras son más vulnerables en el sexo masculino (Wadell, 2016) mostrando los machos unos peores resultados en el test geotáxico negativo (Huang, 2015).

En nuestro trabajo, utilizamos un test motor para poder hacer una evaluación de la eficacia del tratamiento a ese nivel, como ya otros autores habían realizado (Wagner, 2002).

Una de las regiones más dañadas después de un evento HI en los pacientes a término afectos de EHI es el hipocampo (Tuor, 2001). Existen múltiples trabajos que han demostrado la asociación de la lesión del hipocampo con alteraciones en la memoria temporo-espacial (Isaacs, 2000; Allen, 2006).

En neurociencias, el laberinto acuático diseñado en 1984 por Richard G. Morris es un test de comportamiento ampliamente utilizado para testar la memoria temporo-espacial (Camprubi, 2017; Griva, 2017; Kim, 2017). Actualmente existen múltiples variantes de este test, adaptadas al tamaño del animal en cuestión, pero todas ellas son básicamente utilizadas para explorar el papel del hipocampo en la formación de lo conocido como memoria espacial. La memoria espacial es la parte de la memoria responsable de reconocer la información sobre el entorno y sobre la organización espacial. Ésta participará activamente en la consolidación del aprendizaje y constituye una parte fundamental de lo que se conoce como memoria explícita. La memoria explícita se considera uno de los procesos mentales superiores. Generalmente está

procesada a partir de información sensorial inicial (visión y/o propiocepción). En los mamíferos, este proceso tiene lugar en el hipocampo, particularmente en el área CA1.

Hay diversos trabajos que han utilizado el laberinto acuático de Morris para evaluar la eficacia de diferentes estrategias neuroprotectoras en modelos animales de EHI (Wagner, 2002; de Paula, 2009) encontrando una correlación entre el daño cerebral histológico y los resultados obtenidos en las pruebas.

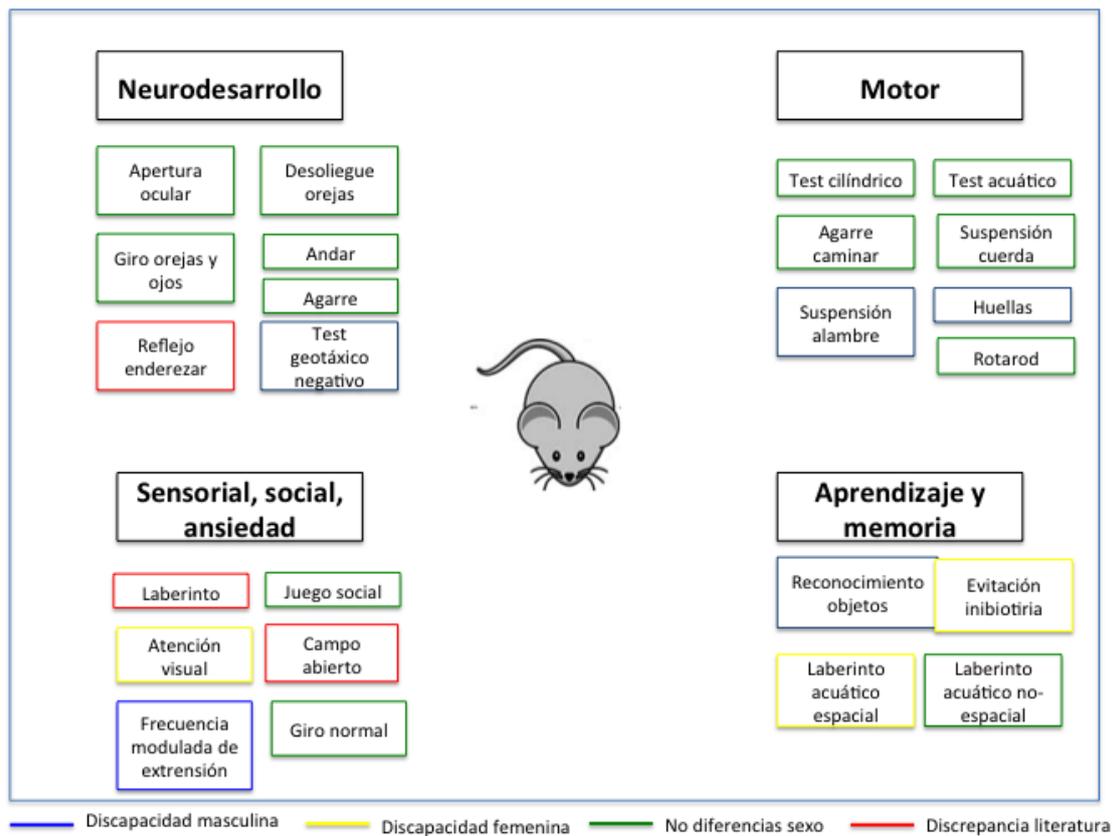


Figura 32. Ilustración esquemática que muestra los diferentes vías de comportamiento y sus diferencias según el sexo.

5.7 Extracción de LCR en crías de rata y análisis de valores de PS100B

En la misma línea de lo descrito, y con la idea de hacer más translacional el eje de nuestra investigación, existen algunos biomarcadores utilizados en la práctica clínica que se pueden determinar en modelos animales.

En las unidades de cuidados intensivos neonatales, el análisis de biomarcadores de LCR como la proteína S100 β (PS100 β) o la enlaza neuronal específica (NSE) en pacientes con EHI se ha convertido en una herramienta indispensable para una correcta valoración de su gravedad (Benet, 2010; Mir, 2014; Zaigham, 2017). Este biomarcador no sólo ha sido utilizado para poder ayudar a establecer un pronóstico a pie de cama en casos de EHI sino también en otras patologías que implican algún tipo de insulto cerebral post-natal (Sun, 2012). Un ejemplo de ello son los trabajos realizados en neonatos afectos de cardiopatías congénita, estos pacientes pueden requerir de la realización de una intervención quirúrgica cardíaca durante la cual el cerebro puede sufrir una disminución de la perfusión y hipoxia (Yuan, 2014; Varrica, 2015).

A pesar de su amplia utilización en la práctica clínica, existe poca evidencia sobre su utilización como marcador en LCR de daño HI en crías de rata. Por el contrario existen diferentes trabajos en ratas adultas, donde si que se ha reportado la determinación de PS100 β en LCR o en sangre como una buena herramienta para valorar el daño neural (Vicente, 2007; Maciel, 2014; Liu, 2015).

La proteína S100 β pertenece a una familia multigénica de proteínas de bajo peso molecular (9-13 kDa) ligantes de calcio (Wilder, 1998) (Figura 33).

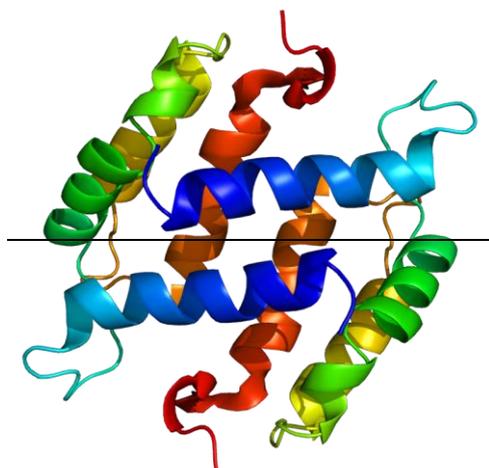


Figura 33. Estructura molecular de la PS100 β . Imagen obtenida de Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and hematology. <http://atlasgeneticsoncology.org>

Se encuentra en abundancia en las células gliales del SNC siendo secretada de una forma activa por la astroglia. A nivel intracelular, la PS100 β participa en la transmisión

de señales gracias a la inhibición de la fosforilación proteica, la regulación de la actividad enzimática y de la homeostasis del calcio. También es una parte importante de la morfología celular al interactuar con elementos del citoesqueleto (Huttunen, 2000).

En concentraciones nanomolares la PS100 β tiene un papel neuroprotector y neurotrófico pero en concentraciones micromolares causa la muerte de los astrocitos al estimular la expresión de citoquinas proinflamatorias induciendo la apoptosis (Rothermundt, 2003) (Figura 34).

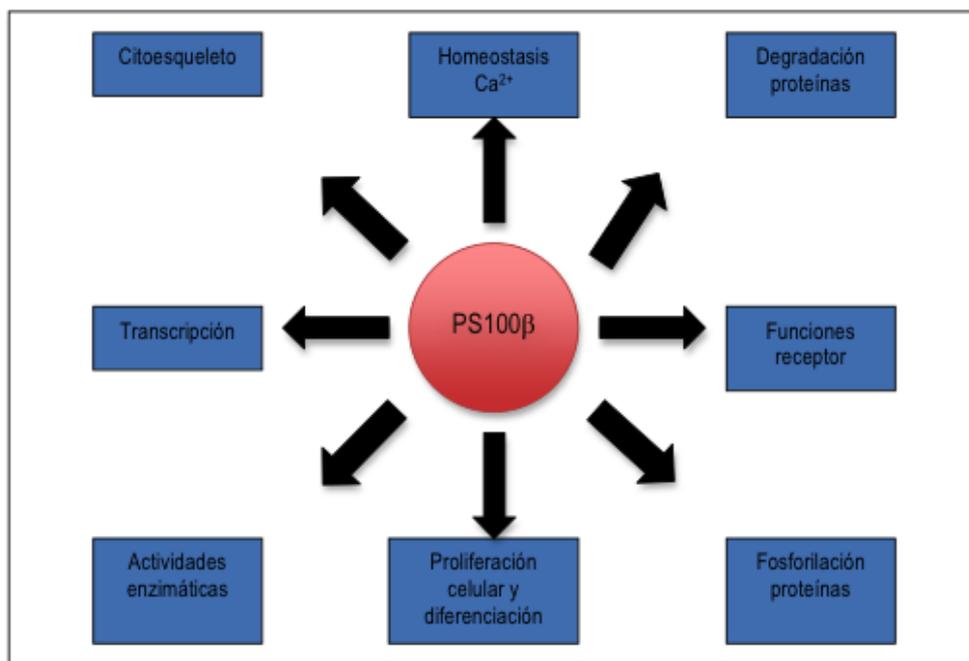


Figura 34. Funciones de la PS100 β dentro de la célula.

En las unidades de críticos de adultos y pediátricos los niveles de PS100 β , tanto en LCR como en sangre, se empezaron a utilizar en la pasada década como un parámetro de activación de la glía o de muerte neuronal en diversas situaciones donde se había podido producir un daño cerebral, encontrándose una correlación entre los que presentaban una mayor elevación con una mayor afectación y daño neuronal (Berger, 2002; Petzold, 2003; Beharier, 2012).

Con esta premisa se evaluó en recién nacidos afectados de EHI para valorar el grado de lesión cerebral que presentaban (Florio, 2010; Douglas-Escobar, 2012) demostrándose su uso

potencial tanto a nivel de LCR (Lv, 2015) como también a nivel de serum y orina (Gazollo, 2003; Liu, 2010).

Paralelamente a su implementación en el estudio de las lesiones neuronales en pacientes críticos, se empezaron analizar los niveles de PS100 β en diferentes modelos de daño neuronal tanto en roedores (Cao, 2008) como en otras especies animales (Fugi, 2004). En 1996, Huang y colaboradores, describieron los valores de normalidad de PS100 β en LCR de ratas adultas (Huang, 1996).

A partir de aquí se han realizado múltiples trabajos utilizándola como marcador de shock traumático (Pelinka, 2003), daño neuronal secundario a shock cardíaco (Cai, 2011) o sepsis (Rosengarten, 2009), todos ellos en rata adulta, existiendo sólo un estudio dónde se han analizado niveles de PS100 β en crías de rata (Vicente, 2007). El principal motivo de la escasa cantidad de estudios es la dificultad técnica para la obtención de LCR con las herramientas descritas hasta el momento.

En rata adulta existen diferentes métodos para la obtención de LCR. La colocación de una cánula o catéter dentro del cerebro del animal ha sido el método más utilizado y descrito en la literatura (Boumman, 1979; LoPachin, 1981). También se ha obtenido con éxito muestras de LCR mediante la exposición de la membrana atlanto-occipital o de la duramadre (Liu, 2012) o incluso mediante una técnica más sofisticada con ayuda de la ecografía para guiar con éxito la punción (Lu, 2013). Todos estos métodos han sido utilizados en diferentes trabajos pero no existe información en trabajos con roedores más pequeños o en crías de rata.

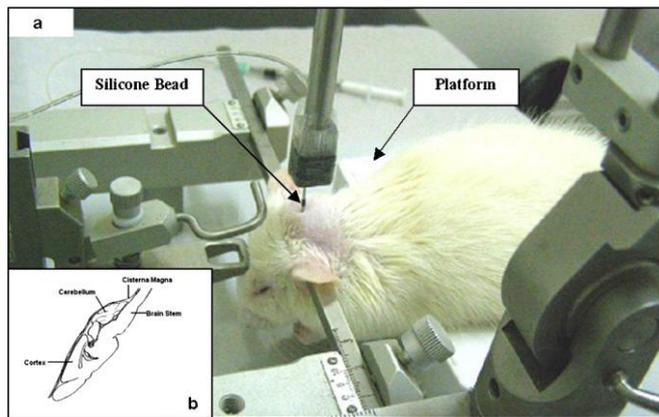


Figura 35. Imagen que muestra la complejidad de un aparato estereotáxico para la obtención de LCR directamente de la cisterna magna de una rata adulta. Imagen obtenida del trabajo del grupo de Yunnus (Mahat, 2012).

Con el objetivo de obtener LCR en crías de rata, nuestro grupo validó una nueva técnica de extracción de LCR en crías de rata (Rodríguez-Fanjul, 2015).

Nuestra técnica se basa en la obtención de LCR mediante la punción de la cisterna magna, en crías de ratas muy pequeñas (menos de 20 gramos, p7-p12), el tipo de animal utilizado en la mayoría de trabajos para el estudio de la EHI (Tang, 2016; Lone, 2017). Mediante esta técnica se ha conseguido obtener una cantidad suficiente de LCR para determinar los niveles de PS100 β y otros parámetros bioquímicos. La punción directa de la cisterna magna mediante una aguja de 24 G no requiere la construcción de ninguna cánula especial o catéter ni tampoco requiere de amplios conocimientos de cirugía estereotáxica. También tiene un bajo coste y es fácilmente reproducible sin requerir de un largo entrenamiento (Consiglio, 2000). Así mismo, se trata de un procedimiento rápido (3 minutos por muestra) comparado con otros métodos descritos (Cao, 2008).

Para su análisis, es imprescindible que las muestras de LCR se encuentren libres de restos sanguíneos. Con nuestro modelo, la visualización directa de la salida de LCR permite descartar aquellas muestras que estén contaminadas con sangre.

Una vez se ha conseguido el entrenamiento suficiente y se ha completado la curva de aprendizaje, la tasa de contaminación de las muestras es baja (menos de un 10%)

siendo menor que la descrita en otros estudios de la literatura, a pesar de ser animales más grandes (Lai, 1983; Lebedev, 2004).

Esta nueva técnica con la que se obtiene un volumen de LCR no depreciable en crías, abre un gran campo de opciones para evaluar diferentes proteínas y biomarcadores en LCR en crías de rata o roedores de pequeño tamaño, no sólo en experimentos que impliquen HI, sino también en modelos de otras patologías.

Tal y como hemos comentado, por su similitud en tamaño, creemos que puede ser un modelo fácilmente aplicabilidad en ratones.

Los valores obtenidos de PS100 β en las crías de rata analizados en este estudio son similares aquellos descritos en ratas adultas (Huang, 1996) (Figura 36).

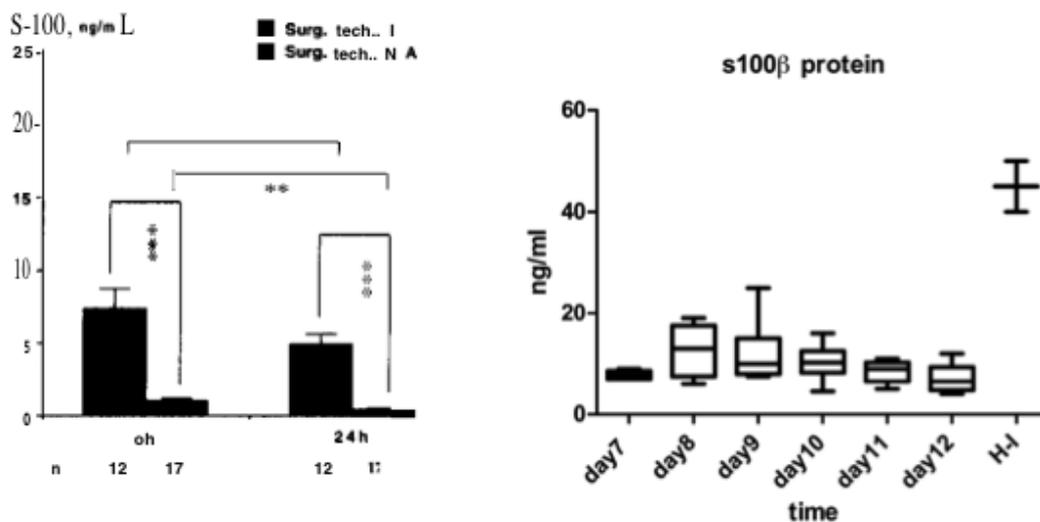


Figura 36. Gráfica con valores de PS100 β en ratas adultas y en crías. A) La gráfica de ratas adultas se encuentra extraída del trabajo de trabajo de Huang (Huang, 1996). B) mientras que la de las crías está extraída del trabajo publicado por nuestro grupo (Rodríguez-Fanjul, 2015). Como se puede ver se obtuvieron unos valores similares a los obtenidos en nuestro trabajo , con una media de 8.5 ng/ml.

La curva de normalidad en los animales de P7 a P12 no presentaron variaciones muy importantes, ni entre edades ni entre sexos. En cambio cuando estos valores se compararon con las muestras obtenidas de los animales sometidos a daño HI, en todos

los casos los valores fueron más altos que en los controles (9.8 vs 45.2 ng/ml). Estos valores son similares a los reportados por otros trabajos donde se determina la PS100β en LCR en animales adultos con lesión del SNC (Margis, 2004).

5.8 Hipotermia moderada en EHI

En recién nacidos afectados de EHI el tratamiento con hipotermia moderada durante las primeras 6 horas después del evento HI durante 72 horas mejora el pronóstico de estos pacientes (Jacobs, 2013). A pesar de los buenos resultados obtenidos, el NNT (número necesario de pacientes a tratar) para mejorar un caso de muerte o discapacidad es de 8 (Gluckman, 2005; Shankaran, 2017).

Uno de los puntos principales para la efectividad es que esta se inicie dentro de la ventana terapéutica (Gunn, 2006). Gracias a los estudios en modelos animales, por ejemplo en crías de cordero, se evidenció que la hipotermia debía iniciarse durante el período de fase latente (entre 90 minutos y 3 horas después del evento isquémico) cuando la actividad cerebral se recupera casi hasta niveles normales (Gunn, 1997). En contraste, si el tratamiento empezaba una vez acontecida la fase latente (6 horas más tarde que la fase isquémica) sólo se objetivaba una mejoría parcial en la recuperación neuronal, sin evidenciarse protección en la supervivencia de los oligodendrocitos (Gunn, 1998; Gunn, 1999; Roelfsema, 2004). Estos resultados fueron confirmados por un trabajo posterior en el que se demostraba que los pacientes presentaban mejores resultados a nivel motor si la hipotermia se iniciaba de forma precoz (entre las 3 y las 6 horas) (Thoresen, 2013) pero curiosamente sólo un 12% de los neonatos que recibieron tratamiento con hipotermia esta se inicio dentro de las primeras 4 horas post-evento HI (Edwards 2010). La demora en la instauración del tratamiento puede ser causada por la dificultad en el diagnóstico de la EHI, como describen algunos trabajos (Douglas, 2015).

Los estudios preclínicos en animales mostraron controversias en cuanto la duración del tratamiento con hipotermia y la profundidad del mismo (Coulborne, 1994; Clar, 2008; Clark, 2008) sugiriendo que existe una compleja relación entre la gravedad del insulto, el

momento de instauración de la hipotermia y la duración de la misma contribuyendo todos ellos a la efectividad del tratamiento.

Pero cuando estos resultados se extrapolaron a seres humanos y se hizo un estudio randomizado para prolongar el tratamiento (más allá de las 72 horas) y disminuyendo la temperatura (por debajo de 32 °C) se tuvo que suspender el estudio por la tendencia a una mayor mortalidad durante el período neonatal (Shankaran, 2008).

5.9 Alopurinol en EHI

El cerebro es el órgano del cuerpo humano con mayor consumo metabólico. Es capaz de mantener un frágil equilibrio de la homeostasis redox, dado que tienen una baja capacidad enzimática antioxidante y un gran contenido de lípidos de membrana oxidables (Goldberg, 2000). El cerebro del recién nacido es particularmente susceptible al daño HI, dado que presenta abundantes ácidos grasos insaturados, un alto consumo de oxígeno, menor concentración de enzimas antioxidantes, una alta concentración de hierro libre y una menor mielinización (Ferriero, 2004). Durante la reperfusión y reoxigenación, el sistema antioxidante del neonato se encuentra saturado llevando a una segunda fase de daño neuronal tal como se ha explicado anteriormente que produce una peroxidación lipídica, una desnaturalización de las proteínas, inactivación de los enzimas, daño del DNA, liberación de calcio intracelular y afectación de la estructura del citoesqueleto (Hilario, 2006).

El alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa, de la generación de NO a partir de nitritos y a su vez es quelante de hierro libre y neutralizador de radicales hidroxilo (Russell, 1995).

A principios de los años 90, aparecieron los primeros estudios en animales que demostraron su eficacia neuroprotectora, disminuyendo el tamaño de las lesiones cerebrales en los animales sometidos a un evento HI (Helfman, 1989; Palmer, 1993). En el trabajo de Helfman y colaboradores, se evidenció que los niveles en sangre de

alopurinol y de su metabolito activo el oxipurinol alcanzaban su nivel máximo entre 30 minutos y 1 hora después de su inyección. En el estudio de Palmer se administró el alopurinol a una dosis de 135 mg/kg 15 minutos después del evento HI, evidenciándose que disminuía el contenido de agua en el hemisferio ipsilateral al daño HI y reduciendo la atrofia e incluso aminorando el daño cerebral a largo plazo en las crías de rata inmaduras (Palmer, 1993). Estos resultados se vieron posteriormente confirmados en otros modelos animales de HI (Marro, 1994; Marro, 2006). En todos los casos se demostró el efecto neuroprotector del alopurinol post-evento HI.

Basándonos en la fisiopatología del daño cerebral secundario a la liberación de radicales libres, vía en la que se pretende actuar con la administración de este fármaco antioxidante, parece lógico pensar que el momento óptimo para administrar el tratamiento sería justo en el momento en que se produce el evento (HI). Este puede ser inmediatamente después de un evento HI (post-parto inmediato) o incluso existen algunos trabajos donde se ha administrado alopurinol a gestantes de riesgo con alteración del registro cardiotocográfico (Kaandorp, 2015).

Considerando estos trabajos, nuestros animales recibieron el tratamiento con alopurinol 5 minutos después del evento HI.

5.10 Discusión de los resultados

Este estudio ha valorado el efecto de la terapia dual (hipotermia+alopurinol) después de un evento HI moderado en crías de rata P10. Encontramos signos de reducción de la apoptosis, una mejoría global en el *score* neuropatológico y en el resultado funcional en todos los grupos que recibieron tratamiento (HIA, HIH y HIHA). También se demostró que existen diferencias en la respuesta al tratamiento en función del sexo del animal, siendo las hembras las que presentan una mejoría más evidente con el tratamiento con alopurinol, ya sea solo o en administración conjunta con la hipotermia.

Hipotermia más alopurinol como neuroprotectores

El tratamiento con hipotermia moderada actúa en múltiples vías después de un evento HI, disminuyendo el consumo metabólico, la liberación de radicales de oxígeno, regulando la expresión inflamatoria y la activación de la cascada apoptótica (Drury, 2014). A pesar de la implementación del tratamiento con hipotermia moderada en las unidades de críticos neonatales para los neonatos afectados de EHI (Jacobs, 2013), la hipotermia no confiere un efecto neuroprotector completo (Simbruner, 2010), haciendo necesario la investigación con terapias adicionales para mejorar los resultados neurológicos. Algunos de estos fármacos han sido probados en modelos animales para potenciar el efecto de la hipotermia moderada incluyen el xenon (Sabir, 2014), la eritropoyetina (Fan, 2013; Fang, 2013), la N-Acetilcisteína (Nie, 2016) y el cannabidiol (Lafuente, 2016; Arruza, 2017). Históricamente, una de las primeras estrategias investigadas para el tratamiento de la EHI fue el alopurinol, una molécula antioxidante capaz de actuar como un agente neuroprotector (Zhang, 2015).

Como hemos visto, el estrés oxidativo es una de las vías que participan en el daño HI (Smit, 2015). El cerebro neonatal maneja mal el estrés oxidativo, con una actividad antioxidante inferior a la disponen los adultos (Aspberg, 1992; Sheldon, 2004). Una de las vías más importantes de daño oxidante es la producción de radicales libres por la xantina oxidasa (XO) (Perlman, 2007). La XO es un enzima que juega un papel clave en el sistema energético del fósforo (Li, 2016). En condiciones fisiológicas, coexiste con la xantina deshidrogenasa (XDH). Diversos investigadores coinciden que la actividad de la XDH consiste en la oxidación sulfídrica o una limitación de la proteólisis a un enzima oxidasa que produce superóxido y peróxido de hidrógeno. Aun así, es conocido que ambos el XO y el XDH pueden oxidar el NAD, con la formación concomitante de especies reactivas de oxígeno (Zhang, 1998; Sanders, 1999). En condiciones basales, la XO y XDH participan en diversas reacciones bioquímicas incluyendo la hidroxilación de diversas purinas, pterinas, etc... Uno de los principales papeles de la XO es la conversión de la hipoxantina en xantina y la xantina en ácido úrico. El alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa. Actúa interrumpiendo la conversión de hipoxantina a xantina y de

xantina a ácido úrico, limitando la producción de radicales libres de oxígeno (Palmer, 1993; Chaudhari, 2012). Además, el alopurinol actúa como un quelante del hierro libre no unido a proteínas y tamponador director de los radicales libres hidroxilos (Peeters-Scholte, 2003). Todas estas propiedades sugieren que podría ser útil como un agente neuroprotector. Palmer y sus compañeros demostraron su eficacia en crías de rata P7 después de un evento hipóxico (Palmer, 1993). Cuando posteriormente fue utilizado en humanos, su beneficio a corto plazo no pudo verse confirmado (Benders, 2006). Aparentemente, no se objetivó ninguna ventaja del tratamiento neonatal cuando el intervalo de inicio del tratamiento era demasiado largo. A pesar de ello, unos años más tarde, cuando el beneficio a largo plazo fue evaluado (4-8 años) en los neonatos tratados con alopurinol (Benders, 2006), aquellos que habían presentado una EHI moderada presentaban una disminución de la muerte y de la discapacidad severa (Kaandorp, 2012).

Como ha sido señalado en diversos estudios, el principal inconveniente del tratamiento con hipotermia moderada o de otros tratamiento neuroprotectores es el poco tiempo del que se dispone durante la ventana terapéutica. Este punto es aun más importante cuando el objetivo es reducir el estrés oxidativo producido por la liberación post HI de radicales libres. El punto óptimo para iniciar el tratamiento antioxidante en estos casos de HI perinatal sería al nacimiento o justo inmediatamente después del nacimiento. Con el objetivo de poder potenciar este efecto neuroprotector, algunos autores han sugerido que la administración prenatal, durante el parto, podría ampliar estos efectos. Torrance y sus colaboradores publicaron que el tratamiento con alopurinol en gestantes con trabajo de parto y sospecha de HI fetal, disminuía los niveles de PS100 β en plasma en los fetos tratados (Torrance, 2009). Algunos años más tarde, un estudio randomizado sugirió que la administración perinatal de alopurinol en las gestantes con sospecha de HI fetal confería un efecto neuroprotector en las niñas.

Los buenos resultados que aparecen después de la administración precoz (periparto), sugieren que el momento de administración del alopurinol es verdaderamente muy importante. Nuestros animales recibieron el tratamiento con alopurinol, muy precozmente, a menos de 15 minutos después del insulto HI. El objetivo de ello era evitar la producción de radicales libres, en el momento inicial. Esta misma situación,

sería similar a la descrita en los trabajos con embarazadas, cuando se administra durante el parto (Kaandorp, 2015).

Valoración histológica

Nuestro trabajo revela que la combinación de hipotermia+alopurinol después de un evento HI moderado en ratas P10 disminuye el infarto y mejora el volumen cerebral residual a las 72 horas, a pesar de que en machos no mejora el efecto neuroprotector del que produce la hipotermia sola. El volumen de infarto a las 72 horas se encontraba disminuido un 33.60% en el grupo que no recibió tratamiento comparado con el 13.41% en el grupo HIA, 5.1% en HIH y 3.8% en HIHA. Estos resultados concuerdan con los de las primeras publicaciones sobre el tratamiento con hipotermia moderada en los que el área infartada se encontraba reducida en un 50% comparada con los grupo control (Yager, 1993). En esas publicaciones, no se detectaron diferencias en función del sexo.

En la misma línea, en nuestro estudio, el volumen del hipocampo se encuentra mejor preservado en las hembras de los grupos tratamiento (HIA, HIH y HIHA) que en las del grupo HI. Es interesante remarcar que la administración del alopurinol parece conferir un mejor efecto neuroprotector en hembras, no sólo en aquellas que recibieron tratamiento combinado (HIHA), si no también en aquellas hembras que recibieron tratamiento exclusivo con alopurinol comparados con HI.

Caspasa

Después de un evento HI, se han descrito tres vías diferentes de muerte celular: la necrosis, la apoptosis y la muerte celular autofágica (Fatemi, 2009; Northington, 2011). Las más conocidas son la necrosis y la apoptosis, a pesar de que la muerte celular mediada por

autofagia se ha convertido en un campo de interés reciente (Descloux, 2015; Roux, 2015). La apoptosis ha sido bien descrita como una vía de muerte celular programada mediada por diferentes vías intracelulares de señalización.

Entre las múltiples vías de muerte programada celular, la caspasa-3 se ha descrito como una de las principales moléculas “ejecutoras”. Por lo que ha sido una de las moléculas más utilizadas como marcador de apoptosis en diversos trabajos (Adachi, 2001; Xiong, 2013; Kwak, 2015). La hipotermia moderada ha demostrado disminuir los niveles de expresión de caspasa-3 en crías de rata (Nie, 2016). En nuestros animales, los niveles de caspasa-3 se encontraban elevados en los animales HI 24-horas después del evento HI, tal y como otros autores habían descrito previamente (Lai, 2011). En el global de animales y en los machos no se detectaron diferencias en los niveles de caspasa-3 entre los animales HI y los HIA. En nuestro trabajo las hembras tratadas con alopurinol presentaron una disminución de la actividad de la caspasa-3 (HIHA, HIA).

Esta descrito que los agentes oxidantes facilitan la activación de la vía de las caspasas que activa la apoptosis (Zhao, 2015). Nuestros resultados sugieren que la administración aislada de alopurinol o la combinación de éste con hipotermia pueden disminuir la activación de la vía de las caspasas en los animales de sexo femenino. Esto disminuiría a su vez la activación de la vía apoptótica, resultando en una reducción del grado de lesión cerebral. Estos hallazgos concuerdan con resultados publicados recientemente que sugieren que la vía de muerte celular programada en las hembras depende principalmente de la vía caspasa (Netto, 2017). Estos resultados van en la misma línea a los publicados por Nie y colaboradores en un trabajo sobre la neuroprotección con N-Acetilcisteína (otra molécula antioxidante) que sugieren que las terapias antioxidantes tienen menor efecto neuroprotector en los machos (Fang, 2013).

Tests de aprendizaje

En cuanto a los resultados funcionales, observamos la misma tendencia que a nivel histológico y molecular. Los animales tratados (HIA, HIH, HIHA) presentaron mejores resultados en el laberinto acuático de Morris. Cuando estos resultados fueron analizados teniendo en cuenta el género, las hembras tratadas con alopurinol (aislado o en combinación con hipotermia) obtuvieron mejores resultados que los machos. La recuperación funcional fue prácticamente completa en las hembras tratadas.

Existen varios trabajos que han demostrado que los animales que sufren un evento HI obtienen peores resultados en el laberinto acuático de Morris tal y como sucede con nuestros animales (Smith, 2014). Moser y colaboradores evidenciaron la existencia de una correlación entre el grado de lesión del hipocampo y los resultados obtenidos en los test de aprendizaje (Moser, 1993).

En nuestros animales, cuando se evaluó de forma global el tamaño del hipocampo, al igual que Palmer en uno de sus primeros trabajos, no encontramos diferencias (Palmer, 1993). Pero cuando se analizó separado por sexo, evidenciamos que las hembras tratadas con alopurinol (HIA) presentaban una mejor preservación del hipocampo, situación que podría correlacionarse también con la mejor evolución del aprendizaje. En los trabajos de Palmer no se analizó si existían diferencias en función del sexo.

Nuestros resultados en los test de aprendizaje mimetizan los descritos por el grupo de Kaandorp (Kaandorp, 2012). Estos autores, a pesar que en el momento agudo no detectaron diferencias en los recién nacidos que habían sido tratados con alopurinol, cuando analizaron los resultados a largo plazo de estos niños (4-8 años), evidenciaron que las niñas del subgrupo de pacientes con EHI moderada presentaban mejores resultados en dos test cognitivos (*Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence* y el *Wechsler Intelligence Scale for Children*).

En nuestro estudio objetivamos una alta eficacia del tratamiento neuroprotector con hipotermia moderada sobre la preservación de la memoria temporo-espacial en crías

de rata p10 tal y al igual que otros trabajos publicados previamente en crías p7 (Wagner, 2002; Sabir, 2012).

Diferencias de género y terapias neuroprotectoras

Existe una evidencia creciente que los mecanismos de muerte celular programada difieren en función del sexo del individuo (Demarest, 2016; Diaz, 2017). Las influencias hormonales y la diferente activación de las cascadas pre-apoptótica en función del sexo, son algunos de los factores que se están estudiando para explicar estas diferencias.

Algunos trabajos sugieren que los niveles de testosterona en los niños durante los primeros años y después de un evento HI, pueden incrementar la liberación de aminoácidos excitatorios incrementado la lesión previamente establecida.

También existe la hipótesis que sugiere que la activación de las cascadas apoptóticas difiere entre machos y hembras, con un desbalance entre la activación caspasa-dependiente y caspasa-independiente (Weis, 2014; Nie, 2016; Rodriguez-Fanjul, 2017)

La actividad de los enzimas mitocondriales no es igual entre sexos (Dukhande, 2009; Brekke, 2015). Las hembras presentan una mayor actividad en el transporte de las cadenas de electrones que los machos (Weis, 2012) y un incremento en la actividad del enzima antioxidante glutatión (Demarest, 2016). La inhibición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial favorece la salida de electrones y la formación de especies reactivas, especialmente el anión superóxido que activará la liberación de radicales libres (Adam-Vizi, 2005). Mientras que en las hembras esta segunda fase de la muerte celular programada depende principalmente de la activación de las caspasas, en los machos predomina la vía caspasa independiente mediada por el AIF (Apoptotic induction factor) (Hagber, 2004; Askalan, 2015). Esta diferencia explicaría porque determinadas terapias neuroprotectoras que pueden modular la activación de la vía de las caspasas, como puede ser el alopurinol, confieren mejores grados de neuroprotección en el sexo femenino y no en el masculino. La liberación del AIF, vía preferente en los machos en la cascada apoptótica, genera una activación de la

fragmentación del DNA y de la condensación nuclear llevando a la muerte celular (Chaitanya, 2010).

Tal como se ha comentado en los apartados anteriores en los últimos años existe una mayor evidencia del diferente efecto HI entre cada uno de los sexos así como de las terapias neuroprotectoras. En nuestro estudio se confirma que existe una variabilidad en la respuesta al tratamiento en función del sexo. Ello se demuestra en los resultados de aprendizaje, en la extensión del daño cerebral y los marcadores biológicos.

En la mayoría de estudios sobre tratamientos neuroprotectores no se han reportado diferencias en el grado de neuroprotección en función del género (Yawno, 2017; Filipi, 2017). Pero si que existen algunos trabajos que sugieren la presencia de diferentes respuestas en función de él (Nie, 2016; Garg, 2017).

En los estudios con pacientes, algunos autores ya apuntaba la existencia de diferencias entre sexos, como el trabajo de Kandoorp donde se objetivó que el tratamiento materno en el momento del parto disminuía los niveles de PS100 β y neuroquetales en los recién nacidos de sexo femenino (Kandoorp, 2015) . Otros trabajos en pacientes con encefalopatía moderada tratados con alopurinol postnatal reportaban su efecto beneficioso en el seguimiento de las niñas.

Igual que en el caso del alopurinol la mayoría de trabajos que evalúan terapias neuroprotectoras no han reportado si había diferencias a nivel histológico entre sexos (Thoresen, 1996; Zhu, 2014; Patel, 2015). Los pocos que lo han hecho, encontraron un incremento de la neuroprotección en hembras (Bona,1998).

5.11 ¿Cuál es el futuro en el tratamiento de la EHI ?

El tratamiento con hipotermia moderada sostenida continúa siendo hoy en día a el único tratamiento efectivo aprobado para la EHI moderada o severa en los recién nacidos a término. Estudios recientes que han probado disminuir la edad gestacional de los pacientes candidatos al tratamiento (34-35 EG) (Rao, 2017) o prolongar la duración y la profundidad del tratamiento (Shankaran, 2014) no han demostrado disminuir la mortalidad.

Es por ello que la búsqueda de nuevos tratamientos que actúen sinérgicamente con la hipotermia moderada es uno de los principales objetivos de la neonatología moderna.

Existen múltiples líneas de investigación desde células madre a fármacos como la eritropoyetina, los cannabinoides, el topiramato y el alopurinol (Figura, 37).

La mayoría de ellos han demostrado tener cualidades muy interesantes para su utilización en los pacientes con EHI.

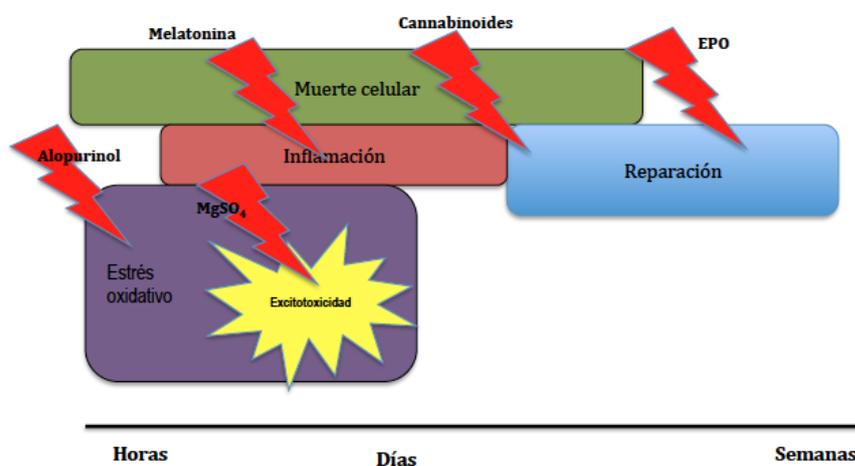
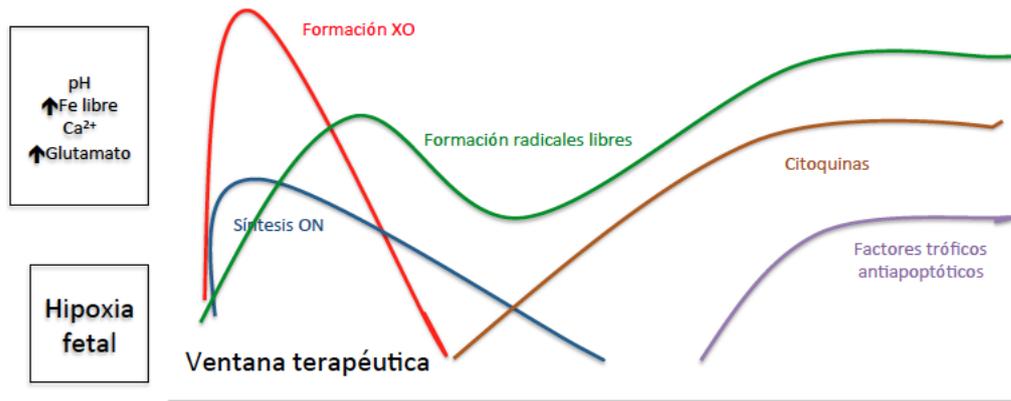


Figura 37. Momentos de acción de las diferentes terapias neuroprotectoras.. Acrónimos: MgSO₄: Sulfato de Magnesio. EPO: Eritropoyetina.

Analizando todos ellos, seguramente el futuro en el tratamiento de la encefalopatía hipóxico-isquémica, será una mezcla de ellos, siempre asociados a la hipotermia. Cada paciente según sus características, sexo, edad gestacional, etc... se beneficiará de un tipo de fármaco o de otro (Figura 38).



Tratamiento perinatal (alopurinol)

Hipotermia

Terapia antioxidante

Efecto según género

Células madre

Figura 38. Momentos de liberación de citoquinas durante un evento HI y acción del alopurinol. Acrónimos: XO: Xantina Oxidasa. ON: óxido nítrico.

Es por ello que continuar en esta línea de investigación, indagando en profundidad cuáles son las características de los sujetos que se benefician de cada terapia específicamente, será el futuro.

6.CONCLUSIONES

6. Conclusiones

En la primera parte del trabajo validamos una nueva técnica para la obtención de LCR en crías de rata. La técnica propuesta es eficaz y útil para la obtención de LCR en crías de rata. Esta conclusión se sustenta en las siguientes observaciones:

1. La punción directa de la cisterna magna en crías de rata de entre 7 y 12 días es una técnica válida, reproducible, económica y más rápida que las técnicas estereotáxicas descritas hasta la fecha, para la extracción de LCR en estos animales.
2. Los niveles de proteína S100 β en líquido cefalorraquídeo en los animales de entre 7 y 12 días no presentan variaciones significativas entre ellos. Siendo los valores de normalidad la proteína S100 β en LCR en crías de rata similares a los descritos en ratas adultas sin lesión neurológica.
3. Las crías de rata sometidas a un evento hipóxico-isquémico presentan valores de proteína S100 β mucho más altos que las crías sanas.

En segunda parte del trabajo, se demuestra que la terapia combinada (hipotermia + alopurinol) confiere una buena neuroprotección cuando se administra en un modelo animal de EHI siendo esta ligada del sexo. Nuestros resultados sugieren que las terapias que actúan inhibiendo la vías de muerte celular dependientes de la vía caspasa, presentan mejores resultados en hembras, en especial aquellas que son terapias antioxidantes como el alopurinol. Esta conclusión se sustenta en las siguientes observaciones:

1. El aumento en los niveles de caspasa-3 que tiene lugar a las 24 horas del evento HI cerebral no es tan marcado en los animales tratados con hipotermia o hipotermia +

alopurinol. Las hembras tratadas con alopurinol también presentan niveles más bajos de caspasa.

2. El tamaño del infarto cerebral medido a las 72 horas post-evento HI es inferior en los animales tratados con hipotermia o hipotermia+alopurinol presentando una reducción del volumen del infarto total y del hipocampo. Las hembras tratadas con alopurinol presentaban así mismo una reducción en el tamaño del infarto.

3. El score neuropatológico a las 72 horas del evento HI es menor en los animales tratados con hipotermia o hipotermia+alopurinol. Las hembras que recibieron tratamiento con alopurinol presentaron un menor score.

4. Los animales sometidos a un evento hipóxico-isquémico presentan una alteración en el aprendizaje a corto y largo plazo. Los animales tratados con hipotermia o hipotermia + alopurinol presentaron una mejoría en los test funcionales a corto (test geotaxis negativo) como a largo plazo (laberinto acuático de Morris). Las hembras tratadas con alopurinol también presentaron una mejoría en los resultados funcionales con diferencias significativas respecto a los animales que no recibieron tratamiento.

7. BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografía

1. Adachi M, Sohma O, Tsuneishi S, Takada S, Nakamura H. Combination effect of systemic hypothermia and caspase inhibitor administration against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2001;50:590-595.
2. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1140-1149.
3. Allen JS, Tranel D, Bruss J, Damasio H. Correlations between regional brain volumes and memory performance in anoxia. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2006;28:457-476.
4. Ali T, Kim MO. Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/KSk3B pathway in the mouse hippocampus. *J Pineal Res.* 2015;59(1):47-59.
5. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martínez-Ibargüen A, Hilario E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):9379-9395.
6. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, et al.: Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 2008;64:653-658.
7. Anghagen M, Rönnbäck L, Hansson E, Ben-Menachem E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem.* 2005;94(4):1124-1130.
8. Angora G, Maranella E, Grandi S, Sbravati F, Coccolini E, Savinis S, et al. Early predictors of short term neurodevelopmental outcome in asphyxiated cooled infants. A combined brain amplitude integrated electroencephalography and near infrared spectroscopy study. *Brain Dev.* 2013;35:26-31.
9. Arruza L, Pazos MR, Mohammed N, Escribano N, Lafuente H, Santos M, et al. Cannabidiol reduces lung injury induced by hypoxic-ischemic brain damage in newborn piglets. *Pediatr Res.* 2017;82:79-86.
10. Ashwal S, Ghosh N, Turenius CI, Dulcich M, Christopher M, Denham BT, et al. The reparative effects of neural stem cells in neonatal hypoxic-schemic injury are not influenced by host gender. *Pediatr Res.* 2014;75:603-611.
11. Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav.* 1975;23:896-920.

12. Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues L, Lavinsky D, Achaval ME, Netto C. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res.* 2010;210:92–98.
13. Askalan R, Gabarin N, Armstrong EA, Fang Liu Y, Couchman D, Yager JY. Mechanisms of neurodegeneration after severe hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2015;1629:94-103.
14. Aspberg A, Tottmar O. Development of antioxidant enzymes in rat brain in reaggregation culture of fetal brain cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1992;66:55-58.
15. Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, et al. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1989;25:445-451.
16. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med.* 2009;361:1349-1358.
17. Azzopardi D, Strohm B, Marlow B, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, et al. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Eng J Med.* 2014;371:140-149.
18. Azzopardi D, Roberson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl 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.
19. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human white matter injury. *J Neurosci.* 2001;21(4):1302-1311.
20. Barks JD, Liu YQ, Shangguan Y, Li J, Pfau J, Silverstein FS. Impact of indolent inflammation on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26(1):57-65.
21. Barone FC, Feuerstein GZ, White RF. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21(1):31-44.
22. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics.* 2001;107(3):480-484.
23. Beharier O, Kahn J, Shusterman E, Sheiner E. S100B a potential biomarker for early detection of neonatal brain damage. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25:1523-1528.

24. Benders M, Bos AF, Rademaker CM, Rijken M, Torrance HL, Groenendaal F, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91:163-165.
25. Bennet L, Booth L, Gunn AJ. Potential biomarkers for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15:253-260.
26. Berntman L, Welsh FA, Harp JR. Cerebral protective effect of low-grade hypothermia. *Anesthesiology.* 1981;55:495-498.
27. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:388-397.
28. Boda D. Results of and further prevention of hypoxic fetal brain damage by inhibition of xanthine oxidase enzyme with allopurinol. *J Perinat Med.* 2011;39(4):441-444.
29. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(16):7162-7166.
30. Boumman H, van Wimersma T. A rapid and simple cannulation technique for repeated sampling of cerebrospinal fluid in freely moving rats. *Brain Res Bull.* 1979;4:575-577.
31. Bower BD, Jones LF, Weeks MM. Cold injury in the newborn. A study of 70 cases. *Br Med J.* 1960;1(5169):303-339.
32. Brekke E, Morken TS, Sonnewald U. Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. *Neurochem Int.* 2015;82:33-41.
33. Cai XY, Lu L, Wang YN, Jin C, Zhang RY, Zhang Q, et al. Association of increased S100B, S100A6 and S100P in serum levels with acute coronary syndrome and also with the severity of myocardial infarction in cardiac tissue of rat models with ischemia-reperfusion injury. *Atherosclerosis.* 2011;217(2):536-542.
34. Camprubí M, Balada R, Ortega JA, Ortega ML, Duran C, Girabent M, et al. Learning and memory disabilities in IUGR babies: Functional and molecular analysis in a rat model. *Brain Behav.* 2017;7(3):e00631.
35. Canevari L, Console A, Tendi EA. Effect of postischemic hypothermia on the mitochondrial damage induced by ischaemia and reperfusion in the gerbil. *Brain Res.* 1999;817:241-245.
36. Cao F, Yang XF, Liu WG. Elevation of neuron-specific enolase and S-100B protein level in experimental acute spinal cord injury. *J Clin Neurosci.* 2008;15:541-544.

37. 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.
38. Carter BS, McNabb F, Merenstein GB. Prospective validation of a scoring system for predicting neonatal morbidity after acute perinatal asphyxia. *J Pediatr.* 1998;132:619-623.
39. Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J (2010). The neuroprotective effect of cannabidiol in an *in vitro* model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. *Neurobiol. Dis.* 2010;37,434–440.
40. Castillo-Melendez M, Baburamani AA, Cabalag C, Yawno T, Witjaksono A, Miller SL, et al. Experimental modeling of the consequences of brief late gestation asphyxia on newborn lamb behavior and brain structure. *Plos One.* 2013;8(11):e77377.
41. Cervos-Navarro J, Diemer NH. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev Neurobiol.* 1991;6(3):149-182.
42. Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(5):293-298.
43. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Comun Signal.* 2010;8:31.
44. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol.* 2010; 68(3):330–341.
45. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000 29(3-4):323-333.
46. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008. Review
47. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012. Review
48. Chavez-Valdez R, Martin LJ, Razdan S, Gauda EB, Northington FJ. Sexual dimorphism in BDNF signaling after neonatal hypoxia-ischemia and treatment with necrostatin-1. *Neuroscience.* 2014; 260:106–119.
49. Chen J, Adachi N, Liu K, Nagaro T, Arai T. Improvement of ischemic damage in gerbil hippocampal neurons by procaine. *Brain Res.* 1998;792(1):16-23.

50. Clark DL, Penner M, Orellana-Jordan IM, Colbourne F. Comparison of 12, 24 and 48 h of systemic hypothermia on outcome after permanent focal ischemia in rat. *Exp Neurol*. 2008; 212:386–392.
51. Clark DL, Penner M, Wowk S, Orellana-Jordan I, Colbourne F. Treatments (12 and 48 h) with systemic and brain-selective hypothermia techniques after permanent focal cerebral ischemia in rat. *Exp Neurol*. 2009;220:391–399.
52. Clowry GJ, Basuodan R, Chan F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy. *Front Neurol*. 2014;5:258.
53. Consiglio AR, Lucion AB. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res Protoc*. 2000;5:109-114.
54. Costa C, Martella G, Picconi B, Prosperetti C, Pisani A, Di Filippo, et al. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke*. 2006;37(5):1319-1326.
55. Cotton CM, Murta AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infant with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2014;164(4):973-979.
56. Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res*. 1994;654:265–72.
57. Davidson JO, Wassink G, van den Heuij LG, Bennet L, Gunn AJ. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Where to from here? *Front Neurol*. 2015;14(6)198.
58. Dean JM, Moravec MD, Grafe M, Abend N, Ren J, Gong X, et al. Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev Neurosci*. 2011;33(3-4):251-260.
59. de Paula S, Vitola AS, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res*. 2009;65:631-635.
60. Demarest TG, Schuh RA, Waddell J, McKenna MC, Fiskum G. Sex dependent mitochondrial respiratory and oxidative stress in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurochem*. 2016;137:714-729.
61. Derks JB, Oudijk MA, Torrance HL, Rademaker CM, Benders MJ, Rosen KG, et al. Allopurinol reduces oxidative stress in the ovine fetal cardiovascular system after repeated episodes of ischemia-reperfusion. *Pediatr Res*. 2010;68:374-380.
62. Descloux C, Ginet V, Clarke PG, Puyal J, Truttman AC. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci*. 2015;45:75–85.

63. Diamandis T, Borlongan CV. One, two, three steps toward cell therapy for stroke. *Stroke* 2015;46(2):588-591.
64. Diaz J, Abiola S, Kim N, Avarrit O, Flock D, Yu J, et al. Therapeutic hypothermia provides variable protection against behavioral deficits after neonatal hypoxia-ischemia: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Neurosci.* 2017;39:257-272.
65. Dingley J, Tooley J, Porter H, Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2006;37(2):501– 506.
66. Dingley J, Tooley J, Liu X, Scull, Brown E, Elstad M, et al. Xenon ventilation during therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy: a feasibility study. *Pediatrics*. 2014; 133(5):809-818.
67. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Int J Mol Sci*. 2015;16:22368-22401.
68. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.*1979;3(1):79-83.
69. Dong G, Ren M, Wang X, Jian H, Yin X, Wang S, et al. Allopurinol reduces severity of delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity in rats. *Neurotoxicology*. 2015;48:171-179.
70. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr*. 2015;169:397–403.
71. Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15(5):287-292.
72. Drury PP, Gunn ER, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clin Perinatol*. 2014;41:161-175.
73. Dukande VV, Isaac AO, Chatterji T, Lai JC. Reduced glutathione regenerating enzymes developmental decline and sexual dimorphism in the rat cerebral cortex. *Brain Res*. 2009;1286:19-24.
74. Edwards AD, Yue X, Squier MV, Thoresen M, Cady EB, Penrice J, et al. Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217:1193-1199.
75. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulseley TC, Bass WT, Kaufman DA, et al. Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: efficacy outcomes. *Pediatr Neurol*. 2005; 32(1):11-17.
76. Elmahdy H, El-Mashad AR, El-Bahrawy H, El-Gohary T, El-Barbary A, Aly H. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics*. 2010;125(5):135-142.

77. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, et al. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med*. 2005;352(20):2069-2081.
78. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol*. 2009;36(4):835–838.
79. Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1975;877: 147–159.
80. Fan X, van Bel F. Pharmacological neuroprotection after perinatal asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med* .2010;3:17-19.
81. Fan X, Heijnen CJ, van der Kooij MA, Groenendaal F, van Bel F. Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice. *Pediatr Res*. 2011;69:56–61.
82. Fan X,,van Bel F, van der Kooij MA, Hijnen CJ, Groenendaal F. Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatr Res*. 2013;73(1):18-23.
83. 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.
84. Fatemi A, Wilson MA, Johnston W. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol*. 2009;36(4):835.858.
85. Fernández-López D, Pazos MR, Tolón RM, Moro MA, Romero J, Lizasoai I, et al. The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res*. 2007;62(3):255-260.
86. Fernández-López D, Pradillo JM, García-Yébenes I, Martínez-Orgado JA, Moro MA, Lizasoian I. The cannabinoid WIN55212-2 promotes neural repair after neonatal hypoxia-ischemia *Stroke*. 2010;41(2):2956-2964.
87. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*. 2004;351:1985-1995.
88. Fillipi L, Poggi C, la Marca G. Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *J Pediatr*. 2010;157(3): 361-366.
89. Fillipi L, Fiorini P, Daniotti M. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeonATI). *BMC Pediatr*. 2012;5(12):144.
90. Filippi L, Fiorini P, Catarzi S, Berti E, Padrini L, Landucci E, et al. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeonATI). *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017;28:1-8.

91. Florio P, Abella R, Marinoni E, et al. 2010. Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front Biosci (Schol Ed.)*.2010;2:47-72.
92. Fotopoulos S, Pavlou K, Skouteli H. Early markers of brain damage in premature low-birth-weight neonates who suffered from perinatal asphyxia and/or infection. *Biol. Neonate*. 2001;79:213–218.
93. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1975;44:147-159.
94. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:97-112.
95. Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, et al. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:275-284.
96. Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain*. 2000;123:499–507.
97. García-Álix A, Martínez Biarge M, Arnaez J. Asfixia intraparto y encefalopatía hipóxico-isquémica. *Protocolos sociedad española de neonatología (SEN)*. 2008.
98. Garg BD, Sharma D, Bansal A. Systematic review seeking erythropoietin role for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: presently where do we stand. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017;23:1-11.
99. Guerrini R, Parmeggiani L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother*. 2006;7:811–823.
100. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365:663-670.
101. Golan H, Hueihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci*. 2006;9:338-349.
102. Goldberg JL, Barres BA. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:579-612.
103. Gong P, Hua R, Zhang Y, Zhao H, Tang Z, Mei X, et al. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cerebral Blood Flow Metab*. 2013;33(6):928-934.
104. Gonzalez FF, Fang A, Ferriero DM. Is erythropoietin the answer? *Pediatr Res*. 2011; 69:2–3.
105. Gonzalez-Rodriguez PJ, Li Y, Martinez E. Dexamethasone protects neonatal hypoxic-ischemic brain injury via L-PGDS-dependent PGD2-DP1-pERK signaling pathway. *Plos One*. 2014;4(9)12.

106. Goren B, Cakir A, Ocalan B, Serter S, Alkan T, Cansev M, et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Res.* 2017;1659:81-87.
107. Granger DN, Kvietys RS. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-551.
108. Griva M, Lagoudaki R, Touloumi O, Nousiopoulou E, Karalis F, Georgiou T, et al. Long-term effects of enriched environment following neonatal hypoxia-ischemia on behaviour, BDNF and synaptophysin levels in rat hippocampus: Effect of combined treatment with G-CSF. *Brain Res.* 2017;1667:55-67.
109. Guerrini R, Parmeggiani L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7(6):811-823.
110. Gunes T, Ozturk M, Koklu E. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol.* 2007;36:17-24.
111. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest.* 1997;99:248-256.
112. Gunn AJ, Gunn TR. The 'pharmacology' of neuronal rescue with cerebral hypothermia. *Early Hum Dev.* 1998;53:19-35.
113. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI, Williams CE, Gluckman PD. Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics.* 1998;102:1098-1106.
114. Gunn AJ, Bennet L, Gunning MI, Gluckman PD, Gunn TRI. Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1999;46:274-80.
115. Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx.* 2006;3:154-169. .
116. Gunn AJ, Thoresen M. Animal studies of neonatal hypothermic neuroprotection have translated well in to practice. *Resuscitation.* 2015;97:88-90.
117. Hankins GD, Speer M. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol.* 2003;102:628-636.
118. Hagberg H, Andersson P, Kjellmer I. Extracellular overflow of glutamate, aspartate, GABA and taurine in the cortex and basal ganglia of fetal lambs during hypoxia-ischemia. *Neurosci. Lett.* 1987;78: 311-317.
119. Hagberg H, Ichord R, Palmer C Animal models of development brain injury: relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third

- Hershey Conference on Developmental Cerebral Flow and Metabolism. *Dev Neurosci.* 2002;24:364-66.
120. Hagberg H, Wilson MA, Matsushita H, Zhu C, Lange M. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem.* 2004;90:1968-1075.
 121. Harper AM. Autoregulation of cerebral blood flow: influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1966;29(5):398-403.
 122. Hassekk KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(6):F541-552.
 123. Hattori H, Wasterlain CG. Posthypoxic glucose supplement reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Ann Neurol.* 1990;28(2):122-28.
 124. Helou, SM., Hudak ML, Jones Jr. Cerebral blood flow response to hypercapnia in immature fetal sheep. *Am. J. Physiol.* 1991;261:1366- 1370.
 125. Hilario E, Alvarez A, Alvarez FJ, Gastiasoro E, Valls-Soler A. Cellular mechanisms in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Curr Pediatr. Rev.* 2006;2:131-141.
 126. Hill C, Threlkeld SW, Fitch RH.. Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29:621–628.
 127. Hilton GD, Nunez JL, McCarthy MM. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. *Neuroscience.* 2003;116:383–391.
 128. 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.
 129. Hope PL, Cady EB, Chu A. Brain metabolism and intracellular pH during ischemia and hypoxia: an in vivo 31 P and 1H nuclear magnetic resonance study in the lamb. *J. Neurochem.*1987;49:75-82.
 130. Huang Y, Säljö A, Suneson A. A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods.* 1995;63:13-22.
 131. Huang Y, Saljo A, Suneson A. Comparison among different approaches for sampling cerebrospinal fluid in rats. *Brain Res. Bull.* 1996;41:273-279.

132. Huang Z, Liu J, Cheung PY, Chen C. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res.* 2009;8:1301:100-109.
133. Huang Z, Lai H, Xu H. Impact of perinatal systemic hypoxic-ischemic injury on the brain of male offspring rats: an improved model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in early preterm newborns. *Plos One.* 2013;6:8(12).
134. Huang H, Wen X-H, Liu H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Neurosci.* 2016;126:647–657
135. Hurn PD, Vannucci SJ, Hagberg H. Adult or perinatal brain injury: does sex matter? *Stroke.* 2005;36:193–95.
136. Huttunen HJ. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and 100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:40096-40105.
137. Ikeda T, Koo H, Xia X, Ikenoue T, Choi B. Bimodal upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury. *Int J Develop Neuroscience.* 2002;20:555-562.
138. Ikonomidou C, Mosinger JL, Olney JW. Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. *Brain Res.* 1989;487:184-187.
139. Inder TE, Hunt RW, Morley CJ, Coleman L, Stewart M, Doyle LW, et al. Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr.* 2004;145(6):835-837.
140. Isaacs EB, Lucas A, Chong WK. Hippocampal volume and everyday memory in children of very low birth weight. *Pediatr Res.* 2000;47:713–720.
141. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev;* 2007 (4):CD003311, doi:10.1002/14651858.CD003311.pub2.
142. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev;*(1); CD003311, doi:10.1002/14651858.CD003311.pub3.
143. Jantzie LL, Robinson S. Preclinical models of encephalopathy of prematurity. *Dev Neurosci.* 2015;37(4-5):277-288.
144. Jantzie LL, Winer JL, Corbett CJ, Robinson S. Erythropoietin modulates cerebral and serum degradation products from excess calpain activation following prenatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci.* 2016;38(1):15-26.
145. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 2011;10:372-382.

146. Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA. Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate*. 2004; 8(2):138-144.
147. Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, Derks JB, Groenendaal F, Rijken M, 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;97:162–166.
148. Kaandorp JJ, van den Broek MP, Benders MJ, Oudijk MA, Porath MM, Bambang Oertono S, et al. Rapid target allopurinol concentrations in the hypoxic fetus after maternal administration during labour. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2014;99:144–148.
149. Kaandorp JJ, Derks JB, Oudijk MA, Torrance HL, Hamsen MG, Nikkels PG, et al. Antenatal allopurinol reduces hippocampal brain damage after acute birth asphyxia in late gestation fetal sheep. *Reprod Sci*. 2014;21:251-259.
150. Kaandorp JJ, Benders MJ, Schuit E, Rademaker CM, Oudijk MA, Porath MM, et al. Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: a novel neuroprotective intervention? A multicenter randomized placebo controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100:216–223.
151. Kane AD, Camm EJ, Richter HG, Lusby C, Tijsseling D, Kaandorp JJ. Maternal-tot-fetal allopurinol transfer and xanthine oxidase suppression in the late gestation pregnant rat. *Physiol Rep*. 2013;1(6):e00156.
152. Kapellou O, Counsell SJ, Kennea N, Dyet L, Saeed N, Stak J, et al. Abnormal cortical development after premature birth shown by altered scaling of brain growth. *Pols Med*. 2006;3(8):e265.
153. Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res*. 2007;61:451–455.
154. Kim GH, Byeon JH, Eun BL. Neuroprotective effect of lacosamide on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats *J Clin Neurol*. 2017;13(2):138-143.
155. Kim BH, Guardia Claudi M, Frondelli M, Nnah IC, Sagicena C, Dobrowolski R, et al. Age-dependent effects of ALK5 inhibition and mechanism of neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Dev Neurosci*. 2017;39:338-351.
156. Knuievsky B, Bazan NG, Yavin E. Generation of arachidonic acid and diacylglycerol second messengers from polyphosphoinositides in ischemic fetal brain. *J. Neurochem*. 1992;59:1812-1819.
157. Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*. 1997;18:44-51.

158. 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.
159. Kwak M, Lim S, Kang E, Furmanski O, Song H, Ryu YK, et al. Effects of neonatal hypoxic-ischemic injury and hypothermic neuroprotection on neural progenitor cells in the mouse hippocampus. *Dev Neurosci*. 2015;37(4-5):428-439.
160. Lai YL, Smith PM, Lamm WJE, Kilde-Brandt J. Sampling and analysis of cerebrospinal fluid for chronic studies in awake rats. *J Appl Physiol*. 1983; 54:1754-1757.
161. Lai YC, Pan KT, Chang GF, Hsu CH, Khoo KH, Hung CH, et al. Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. *Circ. Res*. 2011;109:1375–1386.
162. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, Mohammed N, Santos M, Arizti M, et al. Effects of cannabidiol and hypothermia on short-term brain damage in newborn piglets after acute hypoxia-ischemia. *Front Neurosci*. 2016;10:323.
163. Laptook AR, Corbertt RJ, Burns D, Sterett R. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke*. 1995;26(7):1240-1246.
164. LeBlanc MH, Vig V, Smith B, Parker CC, Evans OB, Smith EE. MK-801 does not protect against hypoxic-ischemic brain injury in piglets. *Stroke*. 1991;22:1270-1275.
165. Leblanc MH, Huang M, Patel D, Smith EE, Devidas M. Glucose given after hypoxic-ischemic does not affect brain injury in piglets. *Stroke*. 1994;25:1443-1448.
166. Lebedev SV, Blinov DV, Petrov SV. Spatial characteristics in rats and novel technique for puncture with a stereotactic manipulator. *Bull Exp Biol Med*. 2004;137:635-638.
167. Lee BS, Woo CW, Kim ST, Kim KS. Long-term neuroprotective effect of postischemic hypothermia in a neonatal rat model of severe hypoxic ischemic encephalopathy: a comparative study on the duration and depth of hypothermia. *Pediatr Res*. 2010;68(4):303-308.
168. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats, *Am J Pathol*. 1960;36:1-17.
169. Li RC, Guo SZ, Lee SK, Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(11):1874-1882.
170. Li Y, Cao TT, Guo S, Zhong Q, Li CH, Li Y, et al. Discovery of novel allopurinol derivatives with anticancer activity and attenuated xanthine oxidase inhibition. *Molecules*. 2016;21(6).

171. Li D, Luo L, Xu M, Wu J, Chen L, Li J, et al. AMPK activates FOXO3a and promotes neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia. *Brain Res Bull.* 2017;132:1-9.
172. Liao Y, Cotton M, Tan S, Kurtzberg K, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(7):890-900.
173. Lievre V, Becuwe P, Bianchi A. Free radical production and changes in superoxide dismutases associated with hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of embryonic rat forebrain neurons in culture. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:1291-1230.
174. Lin TN, He YY, Wu G. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke.* 1993;24:117-121.
175. Lindstrom K, Lindblad F, Hjern A. Preterm birth and attention-deficit/hyperactivity disorder in school children. *Pediatrics.* 2011;127:858-865.
176. Liu Y, Barks JD, Xu G, Silverstein FS: Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke.* 2004;35:1460-1465.
177. Liu M, Shen L, Begg DP, D'Alessio DA, Woods SC. Insulin increases central apolipoprotein E levels as revealed by an improved technique for collection of cerebrospinal fluid from rats. *J Neurosci Methods.* 2012; 209:106-12.
178. Liu H, Li J, Zhao F, Wang H, Qu Y, Mu D. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev Neurosci.* 2015;26:105-17.
179. Liu X, Dingley J, Scull-Brown E, Thoresen M. Adding 5h delayed xenon to delayed hypothermia treatment improves long-term function in neonatal rats surviving to adulthood. *Pediatr Res.* 2015;77(6):779-783.
180. Lowe DW, Fraser JL, Rollins LG, Bentzley J, Nie X, Martin R, et al. Vitamin D improves functional outcomes in neonatal hypoxic ischemic male rats treated with N-acetylcysteine and hypothermia. *Neuropharmacology.* 2017;123:186-200.
181. LoPachin R, Rudy T, Yaksh T. An improved method for chronic catheterization of the rat spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 1981;27:559-561.
182. Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed (secondary) cerebral energy failure after hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1994;36(6):699-706.
183. Lu YG, Wei W, Wang L, et al. Ultrasound-guided cerebrospinal fluid collection from rats. *J Neurosci Methods.* 2013;215:218-223.

184. Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res.* 2005;157:157–165.
185. Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, et al. Xenon and hypothermia combine to provide neuro- protection from neonatal asphyxia. *Ann Neurol.* 2005;58(2):182–193.
186. Maciel ES, Biasibetti R, Costa AP, Lunardi P, Shunck RV, Becker GC, et al. Subchronic oral administration of benzo(A)pyrene imparts motor and cognitive behaviour and modulates S100B levels and MAPKs in rats. *Neurochem.* 2014;39(4):731-740.
187. Mahat MY, Fakrudeen Ali Ahamed N, Chandrasekaran S, Rajagopal S, Narayanan S, Surendran N. An improved method of transcutaneous cisterna magna puncture for cerebrospinal fluid sampling in rats. *J Neurosci Methods.* 2012;211(2):272-279.
188. Mallard EC, Williams CE, Gunn AJ, Gunning MI, Gluckman PD Frequent episodes of brief ischemia sensitize the fetal sheep brain to neuronal loss and induce striatal injury. *Pediatr Res.* 1993;33:61-65.
189. Mallard C, Vexler ZA. Modeling ischemia in the immature brain: How translational are animal models?. *Stroke.* 2015; 46(1):3006-3011.
190. Marro PJ, McGowan JE, Razdan B, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on uric acid levels and brain cell membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity during hipoxia in newborn piglets. *Brain Res.* 1994;650:9-15.
191. Masoaka N, Nakajima Y, Havakawa T, Ohgame S, Hamano S, Nagaishi M. Transplacental effects of allopurinol on supression of oxygen free radical production in chronically instrumented fetal lamb brains during intermittent umbilical cord occlusion. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005;18(1):1-7.
192. Margis R, Zanatto VC, Tramontina F, Vinade E, Lhullier F, Portela LV, et al. Change sin S100B cerebrospinal fluid levels of rats subjected to predator stress. *Brain Res.* 2004;1028(2):213-218.
193. Mari G, Hanif F. Fetal Doppler: umbilical artery, middle cerebral artery, and venous system. *Semin Perinatol.* 2008;32:253-257.
194. Marlow N, Rose AS, Rands CE, Draper ES. Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 2005;90:380–387.
195. Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hipoxia in newborn piglets. *Brain Res.* 2006;1073-1074.
196. Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Wusthoff CJ, Mercuri E, Cowan FM. Antepartum and intrapartum factors preceding neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 2013;132(4):952-959.

197. Masaoka N, Nakajima Y, Hayakawa Y, Ohgame S, Hamano S, Nagaishi M, et al. Transplacental effects of allopurinol on suppression of oxygen free radical production in chronically instrumented fetal lambs brain during intermittent umbilical cord occlusion. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005;18(1):1-7.
198. Maulik D, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Direct measurement of oxygen free radicals during in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain. *Brain Res.* 1998;798:166-172.
199. Mayoral SR, Omar G, Penn AA. Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res.* 2009;66:248–253.
200. Mazur M, Miller RH, Robinson S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. *Journal of neurosurgery Pediatrics.* 2010;6:206– 221.
201. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-163.
202. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol.* 2004;28(6):425-432.
203. Merchant N, Azzopardi D. Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol.* 2015;57:8-16.
204. Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD, Albrecht M, Lucius R, Fösel N, et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care.*2010;14(1):R21.
205. Miller SP, Weiss J, Barnwell A. Seizure-associated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. *Neurology.*2002;58:542–548.
206. Mir IN, Chalak LF. Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit. *Early Hum Dev.* 2014;90(10):707-711.
207. Moretti A, Ramirez A, Mink R. Xanthine oxidase does not contribute to apoptosis after brain hypoxia-ischemia in immature rabbits. *ISRN Neurosci.* 2013:253093.
208. Muller AJ, Marks JD. Hypoxic ischemic brain injury: Potential therapeutic interventions for the future. *Neoreviews.* 2014;15(5):e177-e186.
209. Nagel S, Papadakis M, Pflieger K, Grond-Ginsbach C, Buchan AM, Wagner S. Microarray analysis of the global gene expression profile following hypothermia and transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2012;208:109-122.
210. Nakamura S, Kusaka T, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Koyano K et al. Cerebral blood volume combined with amplitude-integrated EEG can be a suitable

- guide to control hypoxic/ischemic insult in a piglet model. *Brain Dev.* 2013;35:614-25.
211. Nakamura M, Jinnai W, Hamano S, Nakamura S, Koyano K, Chiba Y et al. Cerebral blood volume measurement using near-infrared time-resolved spectroscopy and histopathological evaluation after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. In *J Dev Neurosci.* 2015;42:1-9.
 212. Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke.* 1996;27(5):913-918.
 213. Netto CA, Sanches E, Odorczyk FK, Duran-Carabali LE, Weis SN. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J Neuroscience Research.* 2017;95:409-421.
 214. Nie X, Lowe DW, Rollins LG, Bentzley J, Fraser JL, Martin R, et al. Sexspecific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neurosci Res.* 2016;108:24-33.
 215. Nijboer CHA, Kravellaars A, Van Bel F, Heijnen CJ, Groenendaal F. Gender-dependent pathways of hypoxia-ischemia-induced cell death and neuroprotection in the immature P3 rat. *Dev Neurosci.* 2007;29:385-392.
 216. Noh MR, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, et al: Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* 2006;201:470–478.
 217. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011;69 (5):743–758.
 218. Nuñez A, Benavente I, Blanco D, Boix H, Cabañas F, Chaffanel M, et al. Estrés oxidativo en la asifixa perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica. *An Pediatr (Barc).* 2017. doi:10.106/j.anpedi.2017.05.005
 219. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, et al. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 2009;1305:158-167.
 220. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebo T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation.* 2014;85(4):567-572.
 221. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res.* 1990;27:332-336.
 222. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res.* 1993;33:405-411.

223. Palmer C, Vannucci RC Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin Perinatol.* 1993;20:411-432.
224. Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol.* 1995;22(2):481-517.
225. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:87-99.
226. Patel SD, Pierce L, Ciardiello A, Hutton A, Paskewitz S, Aronowitz E, et al. Therapeutic hypothermia and hypoxia-ischemia in term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. *Pediatr Res.* 2015;78(3):264-271.
227. Patt A, Harken AH, Burton LK, Rodell TC, Piermattei D, Schorr WJ, et al. Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1556-1562.
228. Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, Layunta R, Santo M, Fernández-Ruiz, et al. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacol.* 2012;63:776-783.
229. Peeters C, Hoelen D, Groenendaal F, van Bel F, Bär D. Deferoxamine, allopurinol and oxypurinol are not neuroprotective after oxygen/glucose deprivation in an organotypic hippocampal model, lacking functional endothelial cells. *Brain Res.* 2003;963:72-80.
230. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G, et al. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2003;54:516-522.
231. Peeters-Scholte C, van den Tweel E, Groenendaal F, van Bel F. Redox state of near infrared spectroscopy-measured cytochrome aa(3) correlates with delayed cerebral energy failure following perinatal hypoxia-ischemia in the newborn pig. *Exp Brain Res.* 2004;156:20-26.
232. Pejovic NJ, Herlenius E. Unexpected collapse of healthy newborn infants: risk factors, supervision and hypothermia treatment. *Acta Paediatr.* 2013;102(7):680-88.
233. Pelinka L, Bahrami S, Szalav L, et al. Hemorrhagic shock induces an S100B increase associated with shock severity. *Shock.* 2003;19:422-426.
234. Pereira LO, Strapasson CP, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2008;1218:257-266.

235. Perlman JM. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. *Pediatrics*.1997;99:851-859.
236. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther*. 2006;28(9):1353-1365.
237. Petzelt C, Blom P, Schmehl W, Müller K, Kox WJ. Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon. *Life Sci*. 2003;72(17):1909–1918.
238. Posod A, Wechselberger K, Stanika RI, Obermair GJ, Wegleiter K, Huber E, et al. Administration of secretoneurin is protective in hypoxic-ischemic neonatal brain injury predominantly in the hypoxic-only hemisphere. *Neuroscience*. 2017;352:88-96.
239. Rao R, Trivedi S, Vesoulis Z, Liao SM, Smyser CD, Mathur AM. Safety and short-term outcomes of therapeutic hypothermia in preterm neonates 34-35 weeks gestational age with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2017;183:37-42.
240. Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem*. 1994;62:376 –379.
241. Renolleau S, Fau S, Goyenvalle C, Joly LM, Chavier D. Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role of geneder. *J Neurochem*. 2007;199:1062-1071.
242. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981;9:131-141.
243. Rittenhouse EA, Mori H, Dillard DH, Merendino KA. Deep hypothermia in cardiovascular surgery.1974;17:63-98.
244. Robert AM, Robert L. Xanthine oxido-reducta se, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. *Pathol Oncol Res*. 2014;20:1-10.
245. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain*. 2013;136:90-105.
246. Rodríguez-Fanjul J, Durán C, Camprubí M. A new technique for collection of cerebrospinal fluid in rat pups. *J Exp Neurosci*. 2015;9:1-5.
247. Rodríguez-Fanjul J, Durán Fernández-Feijóo C, Lopez-Abad M, Lopez Ramos MG, Balada Caballé R, Alcántara-Horillo S, et al. *Plos One*. 2017;12(9).
248. Roelfsema V, Bennet L, George S, Wu D, Guan J, Veerman M, et al. Window of opportunity of cerebral hypothermia for postischemic white matter injury in the near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(8):877-886.

249. Rogers EE, Bonifacio SL, Glass HC, Juul SE, Chang T, Mayock DE, et al. Erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Neurol.* 2014;51(5):657-662.
250. Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev.* 1997;47:115-46.
251. Rosenberg AA, Parks JK, Murdaugh E, Parker WD Jr, Mitochondrial function after asphyxia in newborn lambs. *Stroke.* 1989;20(5):674-679.
252. Rosengarten B, Wolff S, Klatt S, Schermuly RT. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition or norepinephrine on the neurovascular coupling in an endotoxic rat shock model. *Crit Care.* 2009;13(4):R139.
253. Rossaint R, Reyle-Hahn M, Schulte Am Esch J, et al; Xenon Study Group. Multicenter randomized comparison of the efficacy and safety of xenon and isoflurane in patients undergoing elective surgery. *Anesthesiology.* 2003;98(1):6-13.
254. Rossato J, Bevilacqua L, Myskiw J. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 2007;14:36-46.
255. Rothermundt M, Peters M, Pren J, Arolt V. 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration . *Microsc. Res. Techn.* 2003;60:614-632.
256. Roth SC, Edwards AD, Cady EB, Delpy DT, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Relation between cerebral oxidative metabolism following birth asphyxia, and neurodevelopmental outcome and brain growth at one year. *Dev Med Child Neurol.* 1992;34:285-295.
257. Roux C, Aligny C, Lesuer C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y, et al. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. *Exp Neurol.* 2015;267:177-193.
258. Russell GA, Cooke RW. Randomised controlled trial of allopurinol prophylaxis in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1995;73(1):F27-F31.
259. Sabir H, Scull-Brown E, Liu X, Thoresen M. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke.* 2012;43:3364-3370.
260. Sabir H, Walloe L, Dingley J, Smit E, Liu X, Thoresen M. Combined treatment of xenon and hypothermia in newborn rats-additive or synergistic effect? *Plos One.* 2014 6;9(10):e109845.
261. Sanches EF, Arteni NS, Scherer EB, Kolling J, Nicola F. Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? *Brain Res.* 2013;1507:105-114.

262. Sanders SA, Massey V. The thermodynamics of xanthine oxidoreductase catalysis. *Antioxid Redox Signal*. 1999;1(3):371-379.
263. Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics*. 1996;98(1):103-107.
264. Shankaran S, Laptook A, Pappas A, McDonald S, Das A, Tyson J, et al. Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312:2629–2639.
265. Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling on death or disability at age 18 months among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2017;318(1):57-67.
266. Sharma J, Johnston MV, Hossain MA, Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BMC Neurosci*. 2014;15:9.
267. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Cristen S, Vexler ZA, Täubr MG, et al. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res*. 2004;55:656-662.
268. Schreyer DJ, Jones EG. Growth and target finding by axons of the corticospinal tract in prenatal and postnatal rats. *Neuroscience*. 1982;7(8):1837-1853.
269. Schubert A. Side effects of mild hypothermia. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1995;7:139-147.
270. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, Bauer R: Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res*. 2005;1058:129–136.
271. Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. *Neuroscience*. 1997;81(1):223-229.
272. Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Mucche R. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of the nEURO.network RCT. *Pediatrics*. 2010;126:771-778.
273. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, Moison R, Ferrali M, Berger HM, et al. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett*. 1998;248:5-8.
274. Shah PS, Bevene J, To T. Postasphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy in neonates: outcome prediction rule within 4 hours of birth. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006;160:729-736.

275. Shah PS, Ohlsson A, Perlman M. Hypothermia to treat neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161:951-958.
276. Shah PS. Hypothermia: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15(5):238-246.
277. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*. 2004;80(2):125-141.
278. Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia*. 2000;41:1:S3-9.
279. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. *N Eng J Med*. 2005;253(15):1574-1584.
280. Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling and deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(24):2629-2639.
281. Shankara S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling on death or disability at age 18 months among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized clinic trial. *JAMA*. 2017;318(1):57-67.
282. Schreyer DJ, Jones EG. Growth and target finding by axons of the corticospinal tract in prenatal and postnatal rats. *Neuroscience*. 1982;7(8):1837-1853.
283. Smit EM Liu X, Gill H, Jary S, Wood T, Thoresen M. The effect of resuscitation in 100% oxygen on brain injury in a newborn rat model of severe hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Resuscitation*. 2015;96:214-219.
284. Smith AL, Alexander M, Rosenkrantz TS. Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. *Exp Neurol*. 2014:54-67.
285. Smith AL, Hill CA, Alexander M. Spatial working memory deficits in male rats following neonatal hypoxic ischemic brain injury can be attenuated by task modifications. *Brain Sci*. 2014;4(2):240-272.
286. Smith AL, Alexander M, Rosenkrantz TS, Sadek ML, Fitch RH. Sex difference sin behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. *Exp Neutol*. 2014;254:54-67.
287. Smit E, Liu X, Gill H, Jary S, Wood T, Thoresen M. The effect of resuscitation in 100% oxygen on brain injury in a newborn rat model of severe hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Resuscitation*. 2015;96:214-219.

288. Sommerfelt K, Markestad T, Ellersten B. Neuropsychological performance in low birth weight preschoolers: A population-based, controlled study. *Eur. J. Pediatr.* 1998;157:53–58.
289. Srinivasakumar P, Zempel J, Wallendorf M, Lawrence R, Inder T, Mathur A. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: electrographic seizures and magnetic resonance imaging evidence of injury. *J Pediatr.* 2013;163:465–470.
290. Srinivasakumar P, Zempel J, Trivedi S, Wallendorf M, Rao R, Smith B, et al. Treating EEG seizures in hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Pediatrics.* 2015;136(5):e1302-1309.
291. Sun J, Li J, Cheng G, Sha B, Zhou W. Effects of hypothermia on NSE and PS100 β protein levels in CSF in neonates following hypoxic/ischaemic brain damage. *Acta Paediatr.* 2012;8:316-320.
292. Statler PA, McPherson RJ, Bauer LA, Kellert BA, Jull SE. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res.* 2007;61(6):671-675.
293. Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS. Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(2):94-101.
294. Strong MJ, Keats AS. Induced hypothermia following cerebral anoxia. 1967;28(5):920-923.
295. Tan WKM, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC, Gluckman PD: Suppression of postischemic epileptiform activity with MK-801 improves neural outcome in fetal sheep. *Ann. Neurol.* 1992;32:677-682.
296. Tan WKM, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC, Gluckman, PD. Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res.* 1993;34:18-22.
297. Tang S, Xu S, Lu X, Gullapalli RP, McKenna MC, Wadell J. Neuroprotective effects of acetyl-L-Carnitine on neonatal hypoxia ischemia-induced brain injury in rats. *Dev Neurosci.* 2016;38(5):384-396.
298. Ten VS, Starkov A. Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol Res Int.* 2012;542976.
299. Teo JD, Morris MJ, Jones NM. Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia-ischemia in the neonatal ratbrain. *Pediatr Res.* 2015;77(6):757-764.
300. Tooley JR, Satas S, Porter H, Silver IA, Thoresen M. Head cooling with mild systemic hypothermia in anesthetized piglets is neuroprotective. *Ann Neurol.* 2003;53(1):65-72.

301. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*. 1995;37:667-670.
302. Thoresen M, Wyatt J. Keeping a cool head, post-hypoxic hypothermia-an old idea revisited. *Acta Paediatr*. 1997;86(10):1029-1033.
303. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology*. 2013;104:228–33.
304. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CM, Bos AF, Van Den Berg P, et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics*. 2009;124(1):350-357.
305. Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol*. 1991;81:578-587.
306. Towfighi J, Mauger D, Vannucci R, Vannucci S. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: A light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997;100:149–160.
307. Trescher WH, Ishiwa S, Johnston MV. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev*. 1997;19(5):326-338.
308. Tucker AM, Aquilina K, Chakkarapani E, Hobbs CE, Thoresen M. Development of amplitude-integrated electroencephalography and interburst interval in the rat. *Pediatr Res*. 2009; 65(1):62-66.
309. Tuor U, Hudzik T, Malisza K, Sydserff S, Kozłowski P, Bigio M. Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats : Correspondence between behavioral, histological and magnetic resonance imaging assessments. *Exp Neurol*. 2001;167:272-281.
310. Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, et al. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics*. 1998;101(2):185-193.
311. Van den Broek AJ, Kok JH, Houtzager BA, Scherjon SA. Behavioural problems at the age of eleven years in preterm-born children with or without fetal brain sparing: a prospective cohort study. *Early Hum Dev*. 2010;86(6):379-384.
312. Van Handel M, Swaab H, de Vries LS, Jongmans MJ. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: A review. *Eur. J. Pediatr*. 2007;166:645–654.
313. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55(2):158-163.

314. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci.* 2005;27:81-86.
315. Varrica A, Satriano A, Tettamanti G, Pelissero G, Gavilanes AD, Zimmermann LJ, et al. Predictors of ominous outcome in infants who undergo cardiac surgery and cardiopulmonary by-pass: S100B protein. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(1):85-90.
316. Vicente E, Tramontina F, Leite MC, Nardin P, Silva M, Karkow AR, et al. S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(11):1126-1130.
317. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 2003 ;198(6):971-975.
318. Volpe JJ. Postnatal sepsis, necrotizing enterocolitis, and the critical role of systemic inflammation in white matter injury in premature infants. *J Pediatr.* 2008;153(2):160-163.
319. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* 2009;8(1):110-124.
320. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2012;72(2):156-166.
321. Waddell J, Hanscoma M, Edwards NS, McKenna MC, McCarthy MM. 2016. Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Exp Neurol.* 2016;275:285– 295.
322. Wagner B, Nedelcu J, Martín E. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2002;51:354-360.
323. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15(22):2922-2933.
324. Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate.* 2001;79(3-4):172-179.
325. Wang X, Han W, Du X, Zhu C, Carlsson Y, Mallard C, et al. Neuroprotective effect of Bax-inhibitor peptide on neonatal brain injury. *Stroke.* 2010;41(9):2050-2055.
326. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *Journal of Experimental Biology.* 2004;207:3221–3312.

327. Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*. 2012;12:271-279.
328. Weis SN, Toniazzo AP, Ander BP, Zhan Z, Careaga M, Ashwood P, et al. Autophagy in the brain of neonates following hypoxia-ischemia shows sex and region-specific effects. *Neuroscience*. 2014;256:201-209.
329. Wilder PT, Rustandi RR, Drohat AC, Weber DJ. S100B inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a calcium dependent manner. *Protein Sci*. 1998;7:794-798.
330. Williams GD, Palmer C, Heitjan DF, Smith MB. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia-ischemia: a ³¹P NMR study in unanesthetized immature rats. *Neurosci Lett*. 1992;144(1-2):103-106.
331. Williams GD, Dardzinski BJ, Buckalew AR, Smith MB. Modest hypothermia preserves cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and correlates with brain damage: a ³¹P nuclear magnetic resonance study in unanesthetized neonatal rats. *Pediatr Res*. 1997;42(5):700-708.
332. Wiggins RC. Myelination: a critical stage in development. *Neurotoxicology*. 1986;7(2):103-120.
333. Whitelaw A. Systemic review of therapy after hypoxic-ischaemic brain injury in the perinatal period. *Semin Neonatol*. 2000;5(1):33-40.
334. Whitelaw A, Thoresen M. Clinical trials of treatments after perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14(6):664-668.
335. Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*. 2013;33(17):7368-7383.
336. Wu YW, Mathur AM, Chang T, McKinstry RC, Mulkey SB, Mayock DE, et al. High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy: A Phase II trial. *Pediatrics*. 2016;137(6).
337. Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, et al. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(3):189-195.
338. Xiong T, Qu Y, Mu D, Ferriero D. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29:583-591.
339. Xiong M, Chen LX, Ma SM, Yang Y, Zhou WH. Short-term effects of hypothermia on axonal injury, preoligodendrocyte accumulation and oligodendrocyte myelination after hypoxia-ischemia in the hippocampus of immature rat brain. *Dev Neurosci*. 2013;35(1):17-27.

340. Xu L, Yenari MA, Steinberg CK, Giffard RG. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(1):21-28.
341. Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res.* 1993;34:525-529.
342. Yager JY, Asselin J. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Stroke.* 1996;27(5):919-925.
343. Yamaguchi M, Okamoto K, Kusando T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, et al. The effects of xanthine oxidoreductase inhibitors on oxidative stress markers following global brain ischemia reperfusion injury in C57BL/6 mice. *Plos One.* 2015;10(7):e0133980.
344. Ylitalo P, Heikkinen ER, Myllyla VV. Evaluation of successive collections of cisternal cerebrospinal fluid in rats, rabbits, and cats. *Exp Neurol.* 1976;50:330-336.
345. Young RS, Kolonich J, Woods CL. Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke.* 1986;17:1313-1316.
346. Yu JH, Seo JH, Lee JE, Heo JH, Cho SR. Time-dependent effect of combination therapy with erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor in a mouse model of hypoxic-ischemic brain injury. *Neurosci Bull.* 2014;30(1):107-117.
347. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, et al. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. *Development.* 2002;129:505-516.
348. Yuan X, Ghosh N, McFadden B, Tone B, Bellinger DL, Obenaus A, Ashwal S. Hypothermia modulates cytokine responses after neonatal rat hypoxic-ischemic injury and reduces brain damage. *ASN Neuro.* 2014;24(6)6.
349. Tang S, Xu S, Lu X, Gullapalli RP, McKenna MC, Waddell J. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on neonatal hypoxia ischemia-induced brain injury in rats. *Dev Neurosci.* 2016;38(5):384-396
350. Tang B, Wang D, Li M, Wu Q, Yang Q, Shi W, et al. An in vivo study of hypoxia-inducible factor 1- α signaling in ginsenoside Rg1-mediated brain repair after hypoxia/ischemia brain injury *Pediatr Res.* 2017;81(1-1):120-126.
351. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Yagel SK. Mild hypothermia after severe transient hypoxia ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res.* 1995;37:667-670.
352. Thoresen M, Bagenholm R, Loberg EM, Apricena F, Kjellmer I. Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1996;74(1):F3-F9.

353. Tooley JR, Satas S, Porter H, et al. Head cooling with mild systemic hypothermia in anesthetized piglets is neuroprotective. *Ann Neurol*. 2003;53:65-72 .
354. Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic in the immature rat. *Acta Neuropathol*. 1991;81(5):578-587.
355. Trescher WH, Ishiwa S, Johnston MV. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev*. 1997;19(5):326-338.
356. Tuor U, Hudzik T, Malisza K, et al. Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats : Correspondence between behavioral, histological and magnetic resonance imaging assessments. *Exp Neurol*. 2001;167:272-281.
357. Yang T, Zhuang L, Rei Fidalgo AM, Petrides E, Terrando N, Wu X. Xenon and sevoflurane provide analgesia during labor and fetal brain protection in perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Plos One*. 2012;7(5):e37020.
358. Yawno T, Mahen M, Li J, Fahey MC, Jenkin G, Miller S. The beneficial effects of melatonin administration following hypoxia-ischemia in preterm fetal sheep. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:296.
359. Ylitalo P, Heikkinen ER, Myllyla VV. Evaluation of successive collections of cisternal cerebrospinal fluid in rats, rabbits, and cats. *Exp Neurol*. 1976; 50:330-336.
360. Zaigham M, Lundberg F, Olofsson P. Protein S100B in umbilical cord blood as a potential biomarker of hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated newborns. *Early Hum Dev*. 2017;112:48-53.
361. Zhang Z, Blake DR, Stevens CR, Kanczler JM, Winyard PG, Symons MC, et al. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Radic Res*. 1998;28(2):151-164.
362. Zhang Q, Lan Y, He XF, Luo CM, Wang QM, Liang FY, et al. Allopurinol protects against ischemic insults in a mouse model of cortical microinfarction. *Brain Res*. 2015;1622:361-367.
363. Zhao P, Zhou R, Li HN, Yao WX, Qiao HQ, Wang SJ, et al. Oxymartine attenuated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via improving antioxidant enzyme activities and inhibiting cell death, *Neurochem Int*. 2015;89:17–27.
364. Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr B, Shibata M. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*. 2005;12:162–176.

365. Zhu C, Kang W, Xu F, Cheng X, Zhang Z, Jia L, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2009;124:218–226.
366. Zona C, Ciotti MT, Avoli M. Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett*. 1997;231(3):123-126.

8.ANEXOS

8.1 Protocolo aprobación CEEA UB



C.E.E.A
(Comitè Ètic d'Experimentació Animal)

Centres Científics i Tecnològics
Edifici Florensa, C/Adolf Florensa n°8, 1ª planta, despatx F14
08028 Barcelona
Telf 934 034 786
ceea@ccit.ub.edu

COMITÈ ÈTIC D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL (CEEA)

Formulari d'acceptació de procediments

DADES PROCEDIMENT

Títol: Neuroprotecció mitjançant teràpia combinada (Hipotèrmia + Alopurinol) en un model animal de dany cerebral hipòxic-isquèmic, en cries de rata wistar

Investigador Responsable: **Marta Camprubí Camprubí**

Un cop examinada la documentació presentada, en compliment del Decret 214/97 de la Generalitat de Catalunya, el CEEA de la UB ha resolt **ACCEPTAR** el procediment sol·licitat.

Signat pels membres del CEEA que han pres l'acord

Barcelona, 10 de març del 2016

NOTA: El CEEA delega en el/la responsable en benestar animal de la Unitat d'Experimentació Animal on s'allotjaran els animals, el seguiment de la realització del procediment d'acord amb el que està establert a la memòria aprovada per aquest comitè.



8.2 Anexo 2. Artículo publicado 1

A New Technique for Collection of Cerebrospinal Fluid in Rat Pups



Javier Rodríguez-Fanjul¹, Cristina Durán Fernández-Feijóo² and Marta Camprubi Camprubi¹

¹Neonatal Intensive Care Unit Service, Hospital de Sant Joan de Déu Maternal, Fetal and Neonatology Center Barcelona (BCNatal), University of Barcelona, Barcelona, Spain. ²Neonatology Service, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Galicia, Spain.

ABSTRACT

BACKGROUND: Neuroprotective strategies to prevent or decrease brain injury in hypoxic ischemic newborns are one of the main research lines in neonatology. Animal models have been used to assess the efficiency of new therapeutic strategies. Brain damage biomarkers in cerebrospinal fluid (CSF) are frequently used to evaluate the outcome at the bedside. Despite the importance of this approach in clinical practice, there are many difficulties in using it in small animals. The aim of this paper was to describe a new technique for collecting CSF in rat pups. Furthermore the reference values of S100 β protein levels, commonly used in common clinical practice, were analyzed in animals between 7 to 12 days.

METHODS: 42 Wistar rat pups aged 7 to 12 days were used. CSF was obtained by direct puncture of the cisterna magna with a 24-gauge needle. S100 β protein levels were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: CSF was successfully obtained in 96% of the cases, with an average amount of 21.28 μ l (5–40 μ l). Normal values for S100 β were described. HI animals presented higher S100 β values than controls.

CONCLUSIONS: A simple, reproducible technique for CSF collection in rat pups has been described. This new method will allow study of brain injury biomarkers in newborn hypoxic ischemic animal models.

KEYWORDS: cerebrospinal fluid collection, rat pups, S100 β -protein, hypoxic-ischemic

CITATION: Rodríguez-Fanjul et al. A New Technique for Collection of Cerebrospinal Fluid in Rat Pups. *Journal of Experimental Neuroscience* 2015;9:37–41 doi:10.4137/JEN.S26182.

RECEIVED: March 17, 2015. **RESUBMITTED:** April 27, 2015. **ACCEPTED FOR PUBLICATION:** April 29, 2015.

ACADEMIC EDITOR: Lora Talley Watts, Editor in Chief

TYPE: Original Research

FUNDING: This work was supported by a private grant from BebeDue, Santa Perpetua de Moguda, Barcelona, Spain. The authors confirm that the funder had no influence over the study design, content of the article, or selection of this journal.

COMPETING INTERESTS: Authors disclose no potential conflicts of interest.

COPYRIGHT: © the authors, publisher and licensee Libertas Academica Limited. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons CC-BY-NC 3.0 License.

CORRESPONDENCE: jrodriguezf@hsjdbcn.org

Paper subject to independent expert blind peer review by minimum of two reviewers. All editorial decisions made by independent academic editor. Upon submission manuscript was subject to anti-plagiarism scanning. Prior to publication all authors have given signed confirmation of agreement to article publication and compliance with all applicable ethical and legal requirements, including the accuracy of author and contributor information, disclosure of competing interests and funding sources, compliance with ethical requirements relating to human and animal study participants, and compliance with any copyright requirements of third parties. This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE).

Published by Libertas Academica. Learn more about this journal.

Introduction

Cerebrospinal fluid (CSF), produced mainly by the choroid plexuses and the ependymal layer of the ventricular system, offers an indirect window on the biological reactions in the central nervous system (CNS). Its analysis has been used for years to detect CNS pathology.¹ Cellularity and molecular characteristics of the fluid, as well as some biomarkers, have been investigated to identify variations in the CNS in response to aggression and neuroprotective therapies.²

Rats are among the most commonly employed species in neuroscience laboratories. However, technical difficulties in CSF extraction and the low volumes obtained have limited the use of this biological fluid in experimental studies. Despite this, different methods for obtaining CSF in adult rats have been described, such as the insertion of a catheter into the cisterna magna,³ cisterna magna direct puncture,⁴ and lumbar puncture on anesthetized animals.⁵ Cisterna magna puncture is the most frequently reported technique, and it has been reported that one can obtain 190 μ L of the fluid in adult rats.⁶ All these methods have been proven in adult rats but they require training and precision. Their most important handicap is blood contamination of the CSF. This problem is common in most of them, which alters the fluid's biomarker values.⁷

Although many animal models have been used to evaluate neuroprotective strategies for newborn brain damage, there are only few studies that explain how to collect CSF in immature rats,^{8–10} because obtaining sufficient quantity of CSF in these animals to determine biochemical parameters is extremely complex.

The protein S100 β (S100 β P) is a great biomarker of brain damage and its levels are increased in blood and CSF in patients with acute CNS injury.¹¹ It is a calcium-binding protein produced by astrocytes¹² and has multiple functions from cytoskeleton and neuron to astrocyte cycle regulation.¹³ S100 β P concentration, particularly in serum and CSF, is used as a neuronal and astrocyte damage marker^{14,15} as well as for the measurement of the effectiveness of neuroprotection strategies.¹⁶ Although S100 β P determination in blood and CSF is commonly used in clinical practice including newborn patients with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE),¹⁷ to our knowledge there is only one study that has analyzed this biomarker in the CSF of rats pups.¹⁰

The aim of our study was to describe and validate a new technique to obtain CSF in rat pups (p7–p12) in order to extract enough amount of fluid to enable the determination of



biomarkers. Moreover, in order to prove its usefulness, we also validate normal S100 β P values in rats pups.

Material and Methods

Animals. Wistar pups aged between 7 and 12 days were used. After birth, the animals were kept with their mothers in cages with 12-hour light/dark cycles at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to food and water. The animals were divided into seven groups according to their age, and another group with brain damage (p7–p12 and HIE, see Table 1).

The experimental procedures were approved by the local ethical committee of the University of Barcelona, following European (2010/63/UE) and Spanish (RD 53/2013) regulations for the care and use of laboratory animals.

CSF collection technique. Animals were placed on a sterile surface and anesthetized with inhaled isoflurane 4%. Once the pup was anesthetized (Fig. 1A), its neck was flexed by placing the head at an angle of 90° allowing visualization of a diamond-shaped surface between the occipital bone and the start of the cervical column (Fig. 1B, C). A 24-G needle was perpendicularly inserted (between 0.5 and 1 mm) with the beveled edge facing upward (Fig. 1). Two investigators performed this procedure, one maintaining the animal in the correct position, and the other inserting the needle.

CSF was collected with an automatic pipette (Fig. 1D). Following extraction, the animals were sacrificed. The CSF was transferred to an Eppendorf tube, and kept frozen at -80°C .

Brain damage animal model. Another group of animals underwent an HIE model using the Rice–Vannucci method.¹⁸

For this procedure, pups were anesthetized with isoflurane (4% induction, 2% maintenance). After this, the rat pups were subjected to left common carotid artery ligation with doubled silk sutures (4.0).

Following the above procedure, rat pups were allowed to recover with the dams for 15 minutes and then were exposed to a hypoxic environment (8% O_2 , 92% N_2) for 90 minutes. During this period, all of them were maintained at 36.5°C . In this group of animals, CSF samples were collected 6 hours after the end of hypoxia.

S100 β protein determination. Enzyme-linked immunosorbent assay kit for S100 calcium binding protein S100 from USCN Life Science Inc. was used to determine the levels of S100 β protein at a dilution of 1/20.

Results

Sample volume. Forty-two pups (54% females) were used. They were divided into seven groups depending on their age [from 7 to 12 days (p7–p12) and one damage group named HIE]. The mean weight of the animals was 20.22 g (14.35–24.65 g) and the brain weight was 0.81 g (0.58–1.07). The duration of anesthesia was 120.39 s (± 19.82). CSF was obtained successfully in 96% of the cases, with an average amount of 21.28 μL (5–40 μL). The aspiration rate was difficult to assess,

Table 1. Data summary of the animals used for the experiment and the results.

	p7	p8	p9	p10	p11	p12	HIE (p10)
Animals number (n)	10	10	10	14	14	10	5
Animal weight (g)	15.07 (13.21–18.3)	15.1 (11.57–18)	17.7 (13.3–20.16)	18.23 (14.83–22.9)	19.8 (17.4–21.2)	22.92 (21.4–23.5)	19.7 (15.85–23)
Anaesthesia time (s)	118 (90–150)	137 (128–150)	127 (107–137)	117 (97–124)	111 (102–125)	116 (90–118)	120 (105–133)
Brain weight (g)	0.64 (0.58–0.74)	0.69 (0.5–0.79)	0.75 (0.68–0.82)	0.8 (0.72–0.89)	0.94 (0.9–1.04)	1.04 (0.98–1.07)	0.83 (0.80–0.85)
CSF amount (μL)	15 (0–25)	20 (5–40)	30 (15–40)	25 (0–40)	20 (5–40)	10 (5–40)	25 (15–40)
% Successes	80	100	100	90	100	100	100
% Contaminated samples	16.6	16.6	0	0	0	0	0
S100 β protein values	8.1 (6.9–9)	17 (6.3–19)	10 (7.5–15)	10.2 (4.5–16.3)	8.5 (5–10)	6 (4–8.5)	45 (40–50)

Note: Data expressed in median and range. Abbreviations: p, Days of life; HIE, Hypoxic-ischemic encephalopathy; g, grams; s, seconds.

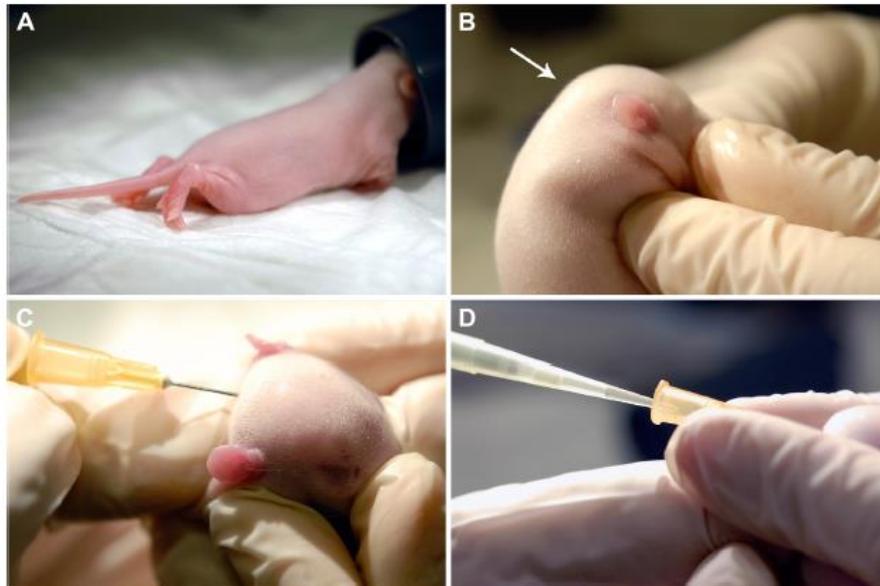


Figure 1. Cerebral spine fluid collection technique. (A, B) After being anesthetized (isoflurane 4%), a rat pup is held by one investigator with the head positioned at 90° angle. The arrow points to the puncture place. The 24 G needle with the bevel up is inserted perpendicularly (B). (C, D) CSF output flows out spontaneously and is collected with a pipette in 20- μ L aliquots and later kept in Eppendorf tubes at -80°C.

but it was less than 20 seconds. The largest amount of CSF was obtained from those animals with higher weights ($P = 0.042$). The CSF amount did not correlate with the animals' age or brain weight ($P > 0.05$). The blood contamination rate in the samples was 4.7%. In Table 1, there is a description of the sample characteristics depending on the group.

S100 β P values in CSF. Blood-contaminated samples were excluded from the analysis. S100 β P values in normal animals ranged between 5 and 25 ng/mL. There were no differences in the time of anesthesia, so this does not seem to influence the S100 β P values.

HIE brain damage was carried out in some animals of 10 days of life, using the Rice-Vannucci model¹⁸ to obtain a damage control group.

The S100 β P values in CSF of HIE animals were significantly higher than those of the control group (9.8 vs 45.2 ng/mL, $P < 0.01$).

The S100 β P values in the first days of life are presented in the graphics (Fig. 2).

Discussion

Clinical use of CSF biomarkers such as S100 β and neuron-specific enolase (NSE)¹⁹ in neurocritical patients has become a standard of management. These biological variables have been validated as great tools to assess the prognosis at the bedside of this group of patients.¹⁷ Although they have been used in

many animal species including adult rats, there have been few studies by including these markers in the CSF of small pups because it was technically very laborious.

The S100 β protein belongs to a multigenic family of low molecular weight (9–13 kDa) calcium-binding S100 proteins.²⁰ It is abundant in the glial cells of the CNS and is actively secreted from astroglia. Intracellularly, S100 β P is involved in signal

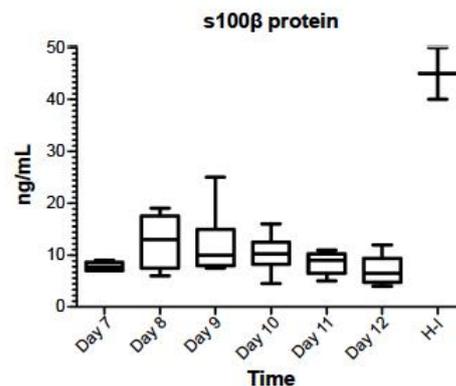


Figure 2. S100 β P normal values in CSF and in HI animals. Normal levels of S100 β from 7 to 12 days of life in control rat pups. HI levels in 10-day-old damaged animals.



transduction via the inhibition of protein phosphorylation and regulation of enzyme activity, and by affecting calcium homeostasis as well as cell morphology by interaction with elements of the cytoskeleton.²¹ At nanomolar concentrations, it exerts a neuroprotective and neurotrophic influence, but at micromolar concentrations it leads to astrocytic death.²² In clinical practice, S100 β P concentrations, particularly in CSF and blood serum, have been used as a parameter of glial activation or death in several situations of brain injury.²³ In the past decade, a number of studies have demonstrated the potential use of S100 β P in detecting brain damage in asphyxiated newborns.²⁴

There have been several papers reporting S100 β P levels in CSF in different rodent models of brain damage.²⁵ Most of these have been in adult rats, including models of trauma shock²⁶ and sepsis,²⁷ but to our knowledge there are no published studies with S100 β P levels and HIE in a rat model. Only Huang and colleagues had described normal S100 β P values in adult rats.⁶

In the present study, we have described a new procedure to obtain CSF samples from small rats using direct cisterna magna puncture. Several methods have been employed for the collection of CSF from adult rats.^{28,29} The most recently published methods involved the exposure of the atlantooccipital membrane or the duramater³⁰ and a very sophisticated technique using ultrasound-guided puncture.³¹ All of these have been validated and used in many adult animal studies. But none of them has been described as a good technique to obtain CSF from small rodents or rat pups.

Our new procedure has been designed to be used in very small animals (less than 20 g) (7–12 days), which are the ones used in models of newborn brain damage.¹⁸ With this technique, enough CSF could be obtained and damage biomarkers could be determined. This will improve the evaluation approach of new strategies for neuroprotection, offering a new perspective, similar to that offered in normal clinical evaluation.

Other techniques described in adult rats involve implanting a permanent catheter³² or else require complex surgical techniques³³ that are not viable in small animals. The new technique does not involve the construction of any special cannula or catheter, and does not require extensive knowledge of stereotactic surgery. It is an inexpensive and easily reproducible procedure even without much training.⁷ Moreover, the new procedure is quicker (taking <1 min/sample) than other described methods.²⁵

Aside from all these important points, the most useful advantage of this new technique is the amount of CSF obtained. Ten to 40 μ L per sample should be enough to perform biological determinations as we have proven in our study.

In addition, direct visualization of the output allows the exclusion of blood-contaminated samples. This is essential to avoid blood cell interference, although the contamination rate of the samples is low (<10%).^{34,35}

Normal values of S100 β P obtained in our study are similar to those described in other studies with adult rats. There is

only one study using rat pups with a small number of animals, so it is difficult to draw conclusions.¹⁰

In control animals, no differences in S100 β P values from P7 to P12 were observed. When S100 β P was evaluated in HI animals, the values were significantly higher than in controls. The S100 β P values were about 4 times higher in animals with HIE than in healthy animals. No control animal had S100 β P values >25 ng/mL. Moreover, when we compared the values between p10 controls and HIE p10 animals, we could see that there were statistically significant differences (10.5 vs 45.2 ng/mL, $P < 0.01$). All these results are similar to those described in humans.³⁶

Although the procedure is really good to obtain CSF in small rats, its main limitation is that the animals have to be sacrificed after the procedure; therefore, this method is not useful for multiple CSF collections at different time points.

Conclusions

In summary, a simple and reliable procedure collecting CSF from the cisterna magna has been described in rat pups. Compared to the existing protocols, this procedure provides not only the advantage of being performed in small animals but also accurately obtaining uncontaminated CSF, which may facilitate the determination of biological markers in the CSF such as S100 β P. A part from that, the normal values of this neural damage biomarker in small pups have been provided.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. Isabel Salas for technical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRF, CDF, MCC. Analyzed the data: JRF, CDF, MCC. Wrote the first draft of the manuscript: JRF, MCC. Contributed to the writing of the manuscript: JRF, CDF, MCC. Agree with manuscript results and conclusions: JRF, CDF, MCC. Jointly developed the structure and arguments for the paper: JRF, CDF, MCC. Made critical revisions and approved final version: JRF, CDF, MCC. All authors reviewed and approved of the final manuscript.

REFERENCES

- Nagyman N, Kömen W, Ko HK, Müller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res*. 2001;49:502–506.
- Van den Berg W, Romeijn S, Verhoef J, Merkus F. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity. *J Neurosci Methods*. 2002;116:99–107.
- Westergren I, Johansson B. Changes in physiological parameters of rat cerebrospinal fluid during chronic sampling: evaluation of two sampling methods. *Brain Res Bull*. 1991;27:283–286.
- Pegg C, He C, Stroink A, Kattner K, Xu Wang C. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods*. 2010;187:8–12.
- De la Calle JL, Pafno CL. A procedure for direct lumbar puncture in rats. *Brain Res Bull*. 2002;59:245–250.
- Huang Y, Saljo A, Suneson A, Hansson A. Comparison among different approaches for sampling cerebrospinal fluid in rats. *Brain Res Bull*. 1996;41:273–279.



7. Consiglio AR, Lucion AB. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2000;5:109–114.
8. Ohki S, Togari H, Sobajima H, Fujimoto S, Kobayashi M, Hyodo J. Lactate attenuates neuron specific enolase elevation in newborn rats. *Pediatr Neurol.* 1999;21:543–547.
9. Vannuci R, Brucklacher R, Vannucci S. The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;5:1026–1033.
10. Vicente E, Tramontina F, Leite MC, et al. S100 β levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:1126–1130.
11. Fink EL, Berger RP, Clark RS, et al. Serum biomarkers of brain injury to classify outcome after pediatric cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2014;42:664–674.
12. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–668.
13. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of gliar-derived PS100 β : beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neural Neurosci.* 2003;21:97–108.
14. Kögel D, Peters M, König HG, et al. PS100 β potentially activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: clinical implications for the role of PS100 β in excitotoxic brain injury. *Neuroscience.* 2004;127:913–920.
15. Böhrer AE, Oses JP, Schmidt AP, et al. Neuron-specific enolase, S100 β , and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2011;68:1624–1630.
16. Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, et al. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology.* 2004;27:1303–1310.
17. Sun J, Li J, Cheng C, Sha B, Zhou W. Effects of hypothermia on NSE and PS100 β protein levels in CSF in neonates following hypoxic/ischaemic brain damage. *Acta Paediatr.* 2012;8:316–320.
18. Vannucci R, Vannucci S. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci.* 2005;27:81–86.
19. Bennet L, Booth L, Gunn AJ. Potential biomarkers for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15:253–260.
20. Wilder PT, Rustandi RR, Drohat AC, Weber DJ. S100B inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a calcium dependent manner. *Protein Sci.* 1998;7:794–798.
21. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterinins 100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40096–40105.
22. Rothermundt M, Peters M, Pren J, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60:614–632.
23. Beharier O, Khan J, Susterman E, Sheiner E. S100B a potential biomarker for early detection of neonatal brain damage. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25:1523–1528.
24. Florio P, Abella R, Marinoni E, et al. Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:47–72.
25. Cao F, Yang XF, Liu WC, et al. Elevation of neuron-specific enolase and S-100B protein level in experimental acute spinal cord injury. *J Clin Neurosci.* 2008;15:541–544.
26. Pelinka L, Bahrami S, Szalav L, Umar F, Redl H. Hemorrhagic shock induces an S100B increase associated with shock severity. *Shock.* 2003;19:422–426.
27. Rosengarten B, Hecht M, Auch D, et al. Microcirculatory dysfunction in the brain precedes changes in evoked potentials in endotoxin-induced sepsis syndrome in rats. *Cerebrovasc Dis.* 2007;23(2–3):140–147.
28. Boumman H, Van Wimersma T. A rapid and simple cannulation technique for repeated sampling of cerebrospinal fluid in freely moving rats. *Brain Res Bull.* 1979;4:575–577.
29. LoPachin R, Rudy T, Yaksh T. An improved method for chronic catheterization of the rat spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 1981;27:559–561.
30. Liu M, Shen L, Begg DP, D'Alessio DA, Woods SC. Insulin increases central apolipoprotein E levels as revealed by and improved technique for collection of cerebrospinal fluid from rats. *J Neurosci Methods.* 2012;209:106–112.
31. Lu YG, Wei W, Wang L, et al. Ultrasound-guided cerebrospinal fluid collection from rats. *J Neurosci Methods.* 2013;215:218–223.
32. Ylitalo P, Heikkinen ER, Myllylä VV. Evaluation of successive collections of cisternal cerebrospinal fluid in rats, rabbits, and cats. *Exp Neurol.* 1976;50:330–336.
33. Huang Y, Säljö A, Suneson A, Hansson H. A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods.* 1995;63:13–22.
34. Lai YL, Smith PM, Lamm WJE, Kilde-Brandt J. Sampling and analysis of cerebrospinal fluid for chronic studies in awake rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1983;54:1754–1757.
35. Lebedev SV, Blinov DV, Petrov SV. Spatial characteristics in rats and novel technique for puncture with a stereotactic manipulator. *Bull Exp Biol Med.* 2004; 137:635–638.
36. Aridas JD, Yawno T, Sutherland AE, et al. Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research. *Exp Neurol.* 2014;261:281–290.

8.3 Anexo 3. Artículo publicado 2

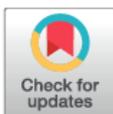
RESEARCH ARTICLE

Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question?

Javier Rodríguez-Fanjul¹, Cristina Durán Fernández-Feijóo², Miriam Lopez-Abad¹, Maria Goretti Lopez Ramos¹, Rafael Balada Caballé³, Soledad Alcántara-Horillo³, Marta Camprubí Camprubí^{1*}

1 Department of Neonatology, BCNatal, Sant Joan de Déu-Hospital Clínic, Barcelona, Spain, **2** Department of Neonatology, Hospital Álvaro Cunqueiro, EOXI, Vigo, Spain, **3** Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, Bellvitge Campus, University of Barcelona, Barcelona, Spain

* mcamprubic@hsjdbcn.org



OPEN ACCESS

Citation: Rodríguez-Fanjul J, Durán Fernández-Feijóo C, Lopez-Abad M, Lopez Ramos MG, Balada Caballé R, Alcántara-Horillo S, et al. (2017) Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question? PLoS ONE 12(9): e0184643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643>

Editor: Olivier Baud, Hopital Robert Debre, FRANCE

Received: January 17, 2017

Accepted: August 28, 2017

Published: September 20, 2017

Copyright: © 2017 Rodríguez-Fanjul et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Bebedue to MC and by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [BFJ2014-55373-R] and from the Generalitat de Catalunya [2014 SGR 1178] to SA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is one of the most important causes of neonatal brain injury. Therapeutic hypothermia (TH) is the standard treatment for term newborns after perinatal hypoxic ischemic injury (HI). Despite this, TH does not provide complete neuroprotection. Allopurinol seems to be a good neuroprotector in several animal studies, but it has never been tested in combination with hypothermia.

Clinical findings show that male infants with (HI) fare more poorly than matched females in cognitive outcomes. However, there are few studies about neuroprotection taking gender into account in the results.

The aim of the present study was to evaluate the potential additive neuroprotective effect of allopurinol when administrated in association with TH in a rodent model of moderate HI. Gender differences in neuroprotection were also evaluated.

Methods

P10 male and female rat pups were subjected to HI (Vannucci model) and randomized into five groups: sham intervention (Control), no treatment (HI), hypothermia (HIH), allopurinol (HIA), and dual therapy (hypothermia and allopurinol) (HIHA). To evaluate a treatment's neuroprotective efficiency, 24 hours after the HI event caspase3 activation was measured. Damaged area and hippocampal volume were also measured 72 hours after the HI event. Negative geotaxis test was performed to evaluate early neurobehavioral reflexes. Learning and spatial memory were assessed via Morris Water Maze (MWM) test at 25 days of life.

Results

Damaged area and hippocampal volume were different among treatment groups ($p = 0.001$). The largest tissue lesion was observed in the HI group, followed by HIA. There were no

Competing interests: This work was supported by Bebedue. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

differences between control, HIH, and HIHA. When learning process was analyzed, no differences were found. Females from the HIA group had similar results to the HIH and HIHA groups.

Cleaved caspase 3 expression was increased in both HI and HIA. Despite this, in females cleaved caspase-3 was only differently increased in the HI group.

All treated animals present an improvement in short-term (Negative geotaxis) and long-term (WMT) functional tests. Despite this, treated females present better long-term outcome. In short-term outcome no sex differences were observed.

Conclusions

Our results suggest that dual therapy confers great neuroprotection after an HI event. There were functional, histological, and molecular improvements in all treated groups. These differences were more important in females than in males. No statistically significant differences were found between HIHA and HIH; both of them present a great improvement. Our results support the idea of different regulation mechanisms and pathways of cell death, depending on gender.

Introduction

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is one of the most important causes of neonatal brain injury. It is associated with high mortality and long-term neurological sequelae [1]. Its global incidence is around 1–3 per 1000 term births in developed countries [2] with a mortality rate between 10–15% in those infants with moderate to severe disease. Among the survivors, at least 36% will present severe neurodevelopmental disabilities and a larger proportion (30%) will present significant problems including global developmental delay, cognitive problems, deafness, and epilepsy [3,4].

Therapeutic hypothermia (TH) has been the only proven treatment for term newborns after perinatal HIE injury [4]. The mechanisms underlying hypothermia neuroprotection are multifactorial. Suppression of excitotoxicity [5], decreasing oxidative stress [6], and inflammation [7] modulation of intracellular signaling and programmed cell death [8] seem to be some of the most important. Although several randomized controlled trials have shown that TH reduces mortality and improves neurodevelopmental outcome among survivors [9,10,11], this therapy does not provide complete neuroprotection [12]. Therefore, new therapeutic approaches to reduce brain injury are necessary. After an HI event, there is a considerable increase in free radical production, lending support to the idea that oxidative stress plays a key role in the pathology of secondary brain injury [13]. Taking all the foregoing into account, it seems reasonable to try to reduce this secondary damage using antioxidant therapies [14,15] in combination with hypothermia [16].

Some of the most important sources of oxygen free radicals are xanthine oxidase products.

Allopurinol is a xanthine oxidase inhibitor, one of the main prooxidant pathways after HI that inhibits the conversion of hypoxanthine into xanthine and uric acid, thereby limiting the toxic overproduction of ROS. It prevents adenosine degradation and oxygen radical formation, and preserves NMDA receptor integrity, so as a consequence it may reduce brain injury in HIE through several mechanisms of action which are independent of the proven beneficial effect of hypothermic treatment in cellular energy metabolism. In high concentrations, it is

also a direct scavenger of the toxic hydroxyl free radical and a chelator of non-protein-bound iron [17].

The first reports of the neuroprotective effects of allopurinol in animal models were published in the early 1990s [18,19]. Initial histology and molecular data showed promising results [20,21], and when allopurinol was tested in humans some beneficial effects were demonstrated on free radical formation, cerebral perfusion, and electrical brain activity, without toxic side effects [22,23]. Despite this, Benders and colleagues, who only included severely asphyxiated infants, concluded that no beneficial effects were detected in the short-term clinical evaluation regardless of its higher safety profile [24,25,26,27]. However, when the long-term neurological outcome of these patients was evaluated, those with moderate HIE treated with allopurinol presented better cognition results, suggesting that neonatal allopurinol treatment may improve long-term results in moderate HIE newborns [25].

Along the same line, a randomized controlled trial focusing on prenatal administration of the drug (NCT001189007) demonstrated that maternal treatment with allopurinol during fetal hypoxia did not significantly lower neuronal damage markers in cord blood. Nonetheless, the *post hoc* analysis revealed a potential beneficial effect in girls [28].

There is increasing evidence of sex differences in HI outcomes, with males exhibiting more severe neurological deficits relative to matched females [29]. *In vitro*, it has been demonstrated that mechanisms of cell death and brain lesion have different sex injury pathways [30,31]. Taking all this into account, it is reasonable to make examine sex-specific treatment effects.

The aim of the present study was to evaluate the effects of combining hypothermia and allopurinol in an animal model of HI brain injury. Sex differences in neuroprotection were also evaluated.

Material and methods

Procedures

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (Permit Number: 6575), following European (2010/63/UE) and Spanish (RD 53/2013) regulations for the care and use of laboratory animals. All surgery was performed under inhaled isoflurane, and all efforts were made to minimize the animals' suffering and the number of them used to carry out the experiments.

Animals and ethics statement

Postnatal day 10 (P10) Wistar rats (HARLAM, Netherlands) were used in this study. After birth, animals were kept with their mothers in cages with 12-hour light/dark cycles at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to food and water. All surgical and experimental procedures were in accordance with the international recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory animals. Experimental procedures were approved by the local ethical committee of the University of Barcelona (Permit Number: 6575), following European (2010/63/UE) and Spanish (RD 53/2013) regulations for the care and use of laboratory animals. All surgery was performed under inhaled isoflurane, and all efforts were made to minimize the animals' suffering and the number of them used.

Animals were euthanized prior to the end of the experiments by the administration of intraperitoneal thiopental after being anesthetized with inhaled isoflurane (2%).

Hypoxia-ischemia animal model. P10 pups were randomized into 5 experimental groups. Neonatal Hypoxia Ischemia (HI) was induced using the Rice-Vannucci model. Briefly,

unilateral ligation of the left common carotid artery was performed and afterwards animals were exposed to 90 minutes of hypoxia (8% oxygen atmosphere), as previously described [26].

At the end of the HI, pups were treated with systemic hypothermia (32.5–33°C) or normothermia (36–36.5°C) in temperature-controlled chambers for 5 hours. Temperature was continuously measured in one pup in each chamber with a rectal temperature probe (IT-21; Physitemp Instruments).

Sham-operated animals were anesthetized and a skin incision was performed to expose the left common carotid artery but without artery ligation or hypoxia.

All treatment groups received a single intraperitoneal injection of allopurinol (Zyloprim sodium, Burroughs Wellcome, Research Triangle Park, NC) at 135 mg/kg (volume: 0.01 ml/g) or saline, 15 min after hypoxia, depending on the randomization, before beginning hypothermia or normothermia protocol. Allopurinol doses were the same as that used by Palmer et al [19].

Animal randomization and experimental design. Five experimental groups were established for global evaluation.

Animals were randomized in: *Sham-treated* (control), *HI+normothermia* (HI), *HI+allopurinol* (HIA), *HI+hypothermia* (HIH), and *HI+hypothermia+allopurinol* (HIHA).

A diagram of the experimental design including the number of animals used for each condition and analysis is presented in Fig 1.

Histological evaluation: Measurement of infarct and hippocampal volume

Pups were deeply anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde 72 hours after the HI injury. Brains were carefully removed and maintained for 12 hours in the same solution at 4°C, and then cryoprotected in 30% Sucrose/PBS at 4°C for 24–48h, and stored at -80°C. Forty μ m coronal sections were made and stained with hematoxylin-eosin. The midline of each brain section was identified on the image and the brain divided by hemispheres (left vs right). Two sections from each block representing cortex, hippocampus, basal ganglia, and thalamus were scanned at 1200 dpi resolution. ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, USA; www.nih.gov) was used to measure the area of viable tissue in the left and right hemispheres. The ratio of the measured brain area was calculated for the two sections per brain and the average percentage of area loss was calculated ($1 - (\text{Area Ratio (right vs left)})$) [16].

Hippocampal volume was analysed comparing the affected hippocampal side with the contralateral hippocampus.

Neuropathological score. Thorensen neuropathological score was used for the cerebral cortex and hippocampus. The evaluation was performed at the same time as the histological evaluation. In the cerebral cortex, scoring was performed as follows: 0: no histological damage; 1: < 10% affected area; small, patchy or incomplete infarcts; 2: 20–30% affected area; partly confluent infarcts; 3: 40–60% affected area, with large confluent infarcts; 4: > 75% affected area; total disaggregation of the tissue.

Findings were: in the hippocampus 1: <20% affected area, necrotic neurons only in the most lateral areas; 2: 50% affected area, patchy areas in all sectors; 3: 75% affected area, with more extensive areas of necrotic neurons; 4: 100% affected, complete infarction of hippocampus including gyrus dentatus [27].

Western blot

Pups were sacrificed by decapitation 24 hours after the HI injury and their brains were rapidly removed and weighed. Protein extracts from the right hippocampus were separated by

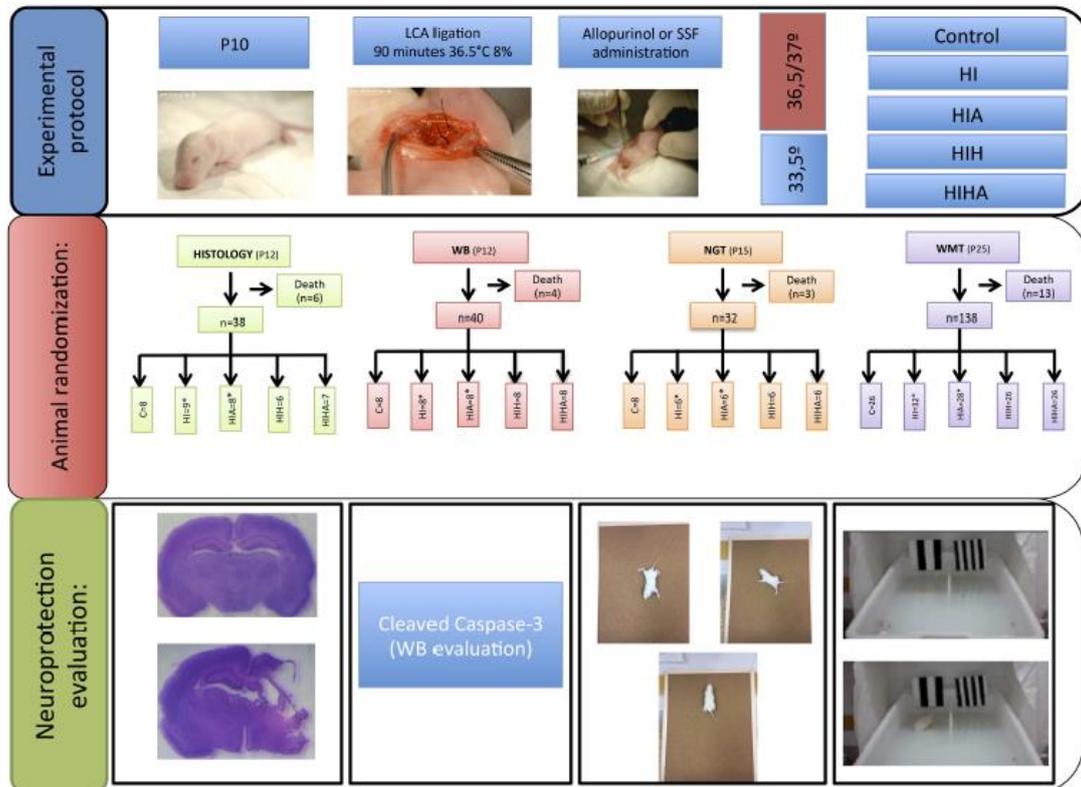


Fig 1. Study diagram. P10: 10 days of life, LCA: Left common carotid, ST: Sham-treated; HI: Hypoxic-ischemic, HIA: Hypoxic-ischemic allopurinol, HIH: Hypoxic-ischemic hypothermia, HIHA: Hypoxic-ischemic hypothermia allopurinol, HE: Histological evaluation, MWM: Water maze test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643.g001>

SDS-PAGE and electro-transferred into a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline and incubated first with primary antibodies against cleaved caspase-3 ((Asp175) (5A1E) Rabbit #Cell signaling, 1/500) or GAPDH (D16H11) XP Rabbit #Cell signaling, 1/20000) overnight at 4°C, and then with their corresponding HRP-conjugated secondary antibody (PROMEGA anti-Rabbit 1/5000). Protein signal was detected using the ECL chemiluminescent system (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Negative geotaxis

On P15, 5 days after the HI insult, the animals underwent the 'negative geotaxis' test, which examines the time taken to rotate 180° from a head-down to a head-up position when placed head down on a 45° slope [32]. This is an innate postural response that appears in the second week of life in normal pups.

Functional evaluation: Water maze test

Spatial memory evaluation was carried out in a version of Morris's water maze pool (MWM) [33] modified for small animals (63 cm l, 43 cm wide, and 35 cm high), with the water temperature set at 22–23°C and water made opaque by latex suspension (Fig 1). The escape latency (EL), defined as the time taken to reach the platform, was measured during each trial as an indicator of learning. At P25, all pups from each experimental group were trained four times per day, for 10 consecutive days.

Statistical analysis

Each litter was randomized to include pups of each sex and treatment group. For histological analysis, western blot and negative geotaxis test, a minimum of $n = 4$ per sex to observe a 50% difference by Wilcoxon signed rank test (80% power, $\alpha = 0.05$) was required. This figure was based on previous studies with antioxidant treatments [34]. For WMT, at least 6 animals per sex and per condition were necessary, as reported in other studies.

The anthropometric results were expressed as mean and range. Infarct and hippocampal volume were expressed as mean \pm SEM. Statistical differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Turkey multiple comparison procedure. For western blot, the values were expressed as a ratio of GAPDH and then converted to percentage of control group (presented as bar diagrams) and represented as mean \pm SEM. Due to problems with ascertainment of normal distribution in small sample sizes, data were also analyzed with non-parametric tests (Kruskal-Wallis test) which yielded identical results and statistical significance. Negative geotaxis test was analysed using a Kruskal-Wallis test. The escape latency of rats in the MWM training was analysed using two-way ANOVA (time, group) with repeated measures, corrected with Bonferroni adjustments. A criterion of $p < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed using Stata 13.

Results

Survival rates, weights, and cephalization index

A total of 260 animals were used during the whole experiment. Twenty-two animals (9.7%) died after the procedure, before being randomized. After the treatment, there were 4 casualties in the HI and 2 in the HIA. None of the animals treated with HIH or HIHA died. There was a significant difference in weight evolution between treated animals and those in the HI group, which were smaller ($P = 0.004$).

Histopathological analysis

Histological evaluation was performed 72 hours after the HI event, in coronal sections stained with hematoxylin-eosin. The mean area loss in the untreated group was 33.60% (± 3.30). The mean area losses in the different treatment groups were: HIA 13.41% (± 3.37); HIH, 5.1% (± 1.04); HIHA, 3.8% (± 0.99). Mean area loss in the control group was 0.37% (± 0.5). Infarct area was reduced in treated animals (HIA HIH, HIHA) with respect to the HI untreated group ($p < 0.0001$) (Fig 2A). No statistically significant differences were found between HIH and HIHA (Fig 2A).

When whole infarct area was analysed by sex, there were no statistically significant differences between males and females ($p = 0.321$). But when it was analyzed by sex and condition, HIA females exhibited a smaller infarct volume than HI females ($p = 0.037$). Moreover, there were no differences in infarct volume among females from the HIA, HIH, and HIHA groups

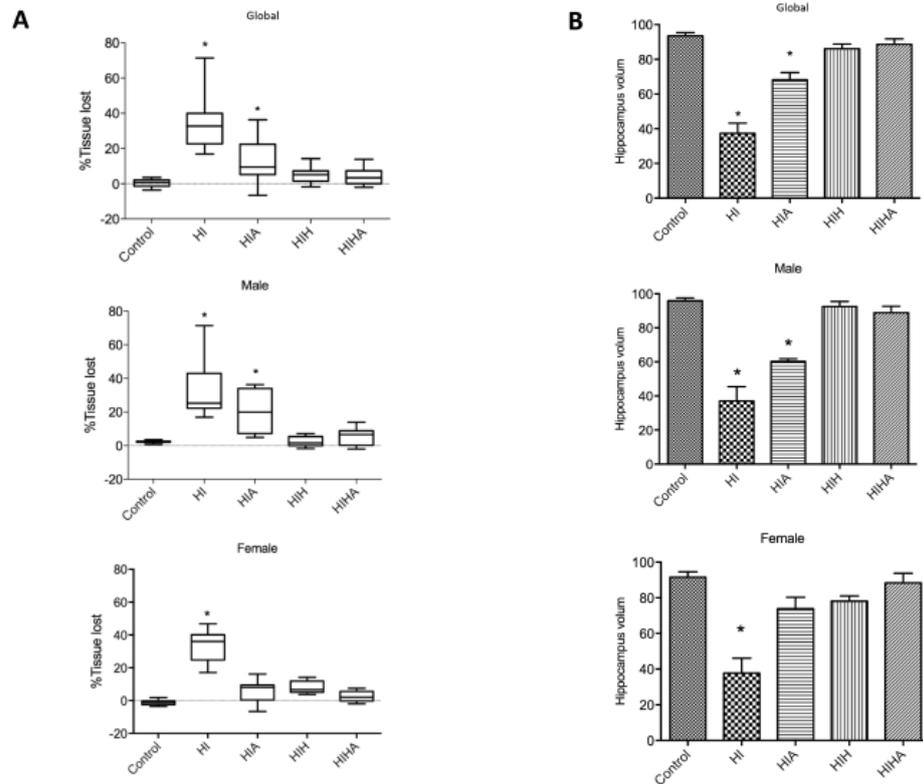


Fig 2. Histological evaluation. A: Graphical representation of the percentage of brain area lost in the affected hemisphere with respect to the contralateral hemisphere by experimental group (global), and by group and gender (Male, Female) B: Graphical representation of the hippocampal volume in the affected hemisphere by experimental group (global), and by group and gender (male, female) ST: Sham-treated; HI: Hypoxic-ischemic, HIA: Hypoxic-ischemic allopurinol, HIH: Hypoxic-ischemic hypothermia, HIHA: Hypoxic-ischemic hypothermia allopurinol. Volume areas are expressed in arbitrary units. * Significant differences $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643.g002>

($p = 0.151$; $p = 1$; $p = 1$) (Fig 2A). In males, infarct area was reduced in HIH and HIHA, but no statistically significant differences were found between HIA and HI (Fig 2A).

There were also differences in hippocampal volume between treatment groups ($p < 0.0001$). HI animals without treatment presented a smaller hippocampus when compared to the others while there were no differences between the HIH, HIHA, and control groups ($p = 1$) (Fig 2B).

When sex was considered, there were no differences in the hippocampal volume between HIA, HIH, and HIHA in females ($p = 0.398$; $p = 1$; $p = 1$). Meanwhile in males, the hippocampal volume of those animals treated with allopurinol was similar to the HI ones, and different from the others ($p = 0.003$) (Fig 2B).

Neuropathological score

Neuropathological score was different in the groups ($p = 0.001$). In the post-hoc analysis, control ($p = 0.001$), HIH ($p = 0.001$), and HIHA ($p = 0.001$) were different from HI and HIA.

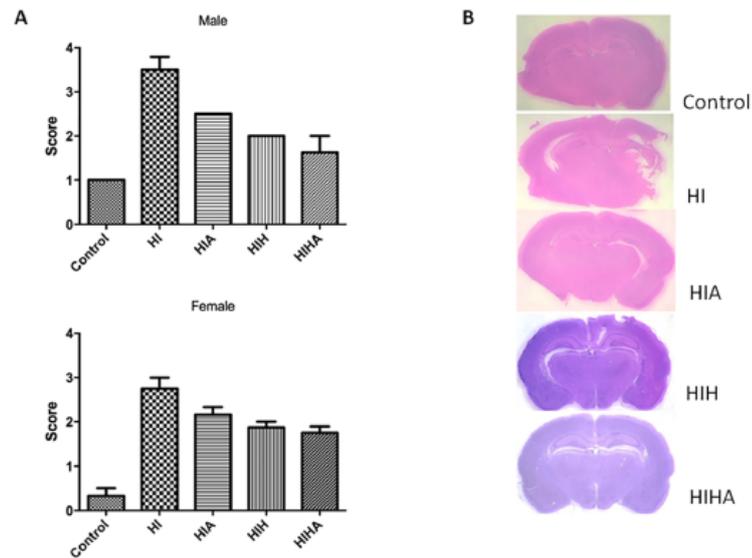


Fig 3. Macroscopic-microscopic histologic evaluation. A: Neuropathological brain scores. B: Representative photograph of perinatal coronal brain sections of the different experimental groups. ST: Sham-treated; HI: Hypoxic-ischemic, HIA: Hypoxic-ischemic allopurinol, HIH: Hypoxic-ischemic hypothermia, HIHA: Hypoxic-ischemic hypothermia allopurinol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643.g003>

Histological structure was better preserved in control and hypothermia-treated animals (HIH and HIHA) than in HI and HIA, in which histological damage was more evident, with large infarcts and affected areas.

When gender was taken into account, there were also differences in males between groups ($p = 0.0004$); control ($p = 0.001$), HIH ($p = 0.0004$), and HIHA ($p = 0.0006$) were different from HI and HIA. In females, there were also differences among all the groups ($p = 0.003$), but control ($p = 0.02$) HIH ($p = 0.036$), HIHA ($p = 0.036$), and HIA ($p = 0.029$) were different from HI (Fig 3).

No differences were detected between HIH and HIHA groups ($p = 0.8039$).

Cleaved caspase-3 activation

To determine whether the observed sex- and treatment-dependent reduction in the infarcted area was due to early protection against apoptosis, the level of cleaved caspase-3, an indicator of apoptosis, was evaluated with western blot (Fig 4). At 24h post-HI, males showed increased levels of cleaved caspase-3 in the HI and HIA groups compared to controls ($p = 0.0032$). Meanwhile cleaved caspase-3 levels remained at control levels in the other treatment groups (HIH and HIHA). In contrast, in females, cleaved caspase-3 was only differently increased in the HI group ($p = 0.0117$) while it remained at control levels in the HIA, HIH, and HIHA groups, which showed reduced cleaved caspase-3 levels when compared to the HI group (HIHA $p = 0.0249$, HIA $p = 0.046$, HIH $p = 0.025$). No differences were detected between the HIH and HIHA groups ($p = 0.4982$).

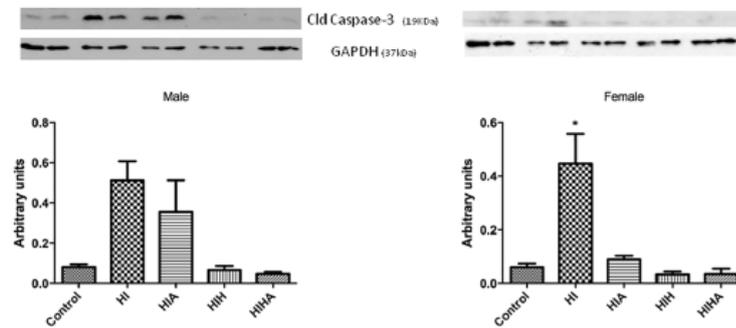


Fig 4. Cleaved caspase-3 expression. Western blot and densitometry analysis of cleaved caspase-3 protein in the hippocampal tissue of males and females from the different experimental groups. GAPDH was used as protein loading control. Abbreviations: Control; HI: Hypoxic-ischemic, HIA: Hypoxic-ischemic allopurinol, HIH: Hypoxic-ischemic hypothermia, HIHA: Hypoxic-ischemic hypothermia allopurinol. * Significant differences $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643.g004>

Negative geotaxis test evaluation

Negative geotaxis test was different between groups ($p = 0.002$). All treatment groups presented better results than non-treated animals. When gender was taken into account these differences were also the same. (See supporting information)

Water maze test evaluation

The Morris water maze test was used to evaluate the effects of the different treatments on learning and spatial memory. For each animal, escape latency (EL) was recorded 4 times a day for ten consecutive days, and the results were analyzed with two-way ANOVA. A graphical representation of learning performance by group and sex is shown in Fig 5. All groups acquired the task and improved their performance over time ($p < 0.0001$), but with significant differences in the learning process, with the HI group being the worst.

Post hoc analysis revealed no differences in learning process among the control, HIH ($p = 0.181$), and HIHA ($p = 0.709$) groups, which were better than HI ($p = 0.001$) and HIA ($p = 0.002$).

Gender was also analysed as a possible confounding learning factor, but no differences were found in learning process between males and females ($p = 0.965$).

Learning progression was then analysed by gender and condition. In males, global learning was different between treatment groups ($p = 0.001$), but there were no differences between control, HIH ($p = 0.18$), and HIHA ($p = 0.502$). Meanwhile for HIA and HI the learning process was significantly worse than for the other groups (HIH, HIHA, and controls) ($p = 0.0001$) ($p = 0.008$).

In females, global learning was also different between groups ($p = 0.001$). When learning process was analysed by treatment only the HI group showed significantly poorer scores ($p = 0.001$), while control, HIH ($p = 0.999$), HIHA ($p = 0.991$), and HIA ($p = 0.719$) showed normal learning performance.

In summary, HIHA is a good neuroprotective strategy, although in males it does not add many benefits to HIH. Our results indicate that in females, HIA and HIHA increase

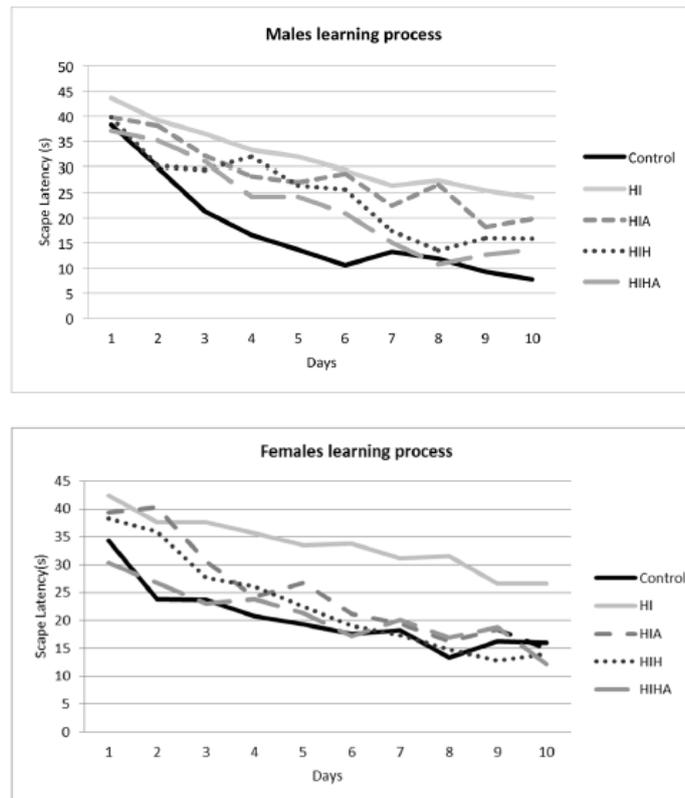


Fig 5. Water maze test. Plot representing the average escape latency in four trials performed each day. Results were expressed as mean of escape latency. Abbreviations: ST: Sham-treated; HI: Hypoxic-ischemic, HIA: Hypoxic-ischemic allopurinol, HIH: Hypoxic-ischemic hypothermia, HIHA: Hypoxic-ischemic hypothermia allopurinol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184643.g005>

neuroprotection, reducing infarct volume and preserving hippocampus. Moreover, their neuroprotective effect was long lasting, as learning outcomes were significantly improved at adolescence.

Discussion

In the present study, we assessed the effect of dual therapy hypothermia + allopurinol (HIHA) after moderate focal HI in P10 rats. We found signs of reduced apoptosis and a global improvement in the neuropathological score and functional outcome in all treatment groups (HIA, HIH, and HIHA). Moreover, a sex-specific benefit of allopurinol treatment was detected. Females from the allopurinol-treated groups showed decreased markers of apoptosis and better water maze performance than males with the same treatment (HIA, HIHA).

TH intervenes in many pathways after HI injury, reducing metabolic rate and glutamate release, decreasing oxygen species, and regulating expression of inflammatory and apoptic cascades [35]. Despite the implementation of TH as a standard of care in many clinical units for HIE [12], it does not provide complete neuroprotection [36], making further investigation into additional therapies to improve neurological outcomes necessary. Xenon [16], Epo [37,38], N-Acetylcysteine (NAC) [34], and cannabidiol [39] are some of the drugs that have been tested in experimental models to potentiate the effects of TH. Historically, one of the first strategies evaluated for HIE treatment was allopurinol, an antioxidant molecule reported to act as a mild neuroprotective agent [40].

Oxidative stress is involved in HI injury physiopathology [41]. The neonatal brain handles oxidative stress poorly, with antioxidant activity less than half of adult levels [42,43]. One of the most important pro-oxidant pathways of free radical production is xanthine oxidase (XO) [44]. XO enzyme plays a key role in the high-energy phosphate system [45]. In physiological conditions, it coexists with xanthine dehydrogenase (XDH). Many investigators agree that XDH activity is converted by sulfhydryl oxidation or limited proteolysis to an oxidase that produces superoxide and hydrogen peroxide. It is worth noting, nevertheless, that both XO and XDH can oxidize NADH, with concomitant formation of reactive oxygen species [46,47]. Physiologically, XO and XDH participate in a variety of biochemical reactions including the hydroxylation of various purines, pterins, and aromatic heterocycles, thereby contributing to the detoxification or activation of endogenous compounds and xenobiotics. One of XOR's primary roles is the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. Allopurinol, a xanthine oxidase inhibitor, acts by interrupting the conversion of hypoxanthine into xanthine and uric acid, limiting the production of toxic reactive oxygen species [19,27]. In addition, allopurinol is a chelator of non-bound protein iron (NBPI) and a direct scavenger of hydroxyl free radicals [48]. All these properties suggest it should be useful as a neuroprotective agent. Palmer and colleagues demonstrated its neuroprotective effects in P7 rats after HI [19]. When it was tested in humans, short-term outcome improvement could not be confirmed [49]. Apparently, no advantage from neonatal treatment was seen when the interval of treatment initiation was very long. Despite this, some years later, when long-term outcome was evaluated (at 4–8 years) in those babies [49], moderately asphyxiated infants treated with allopurinol presented a reduction in the risk of death or severe disability [25].

As has been pointed out in many studies, the major drawback to postasphyxial hypothermia or pharmacological treatment is the small therapeutic window in which treatment must be initiated. This is even truer if the aim is to avoid or reduce free radical stress. The optimal point in time to start antioxidative treatment is at birth or even before birth. Trying to simulate this condition, many authors have suggested that antenatal administration, during labor, could amplify its effects. Torrance and colleagues reported a decrease in p-100B in plasma levels in those fetuses that had received antenatal allopurinol when an HI situation was suspected [50]. Some years later, a randomised controlled trial suggested that allopurinol had a potential neuroprotective effect in girls as indicated by lower S100 β and neuroketal values in the treatment group [51].

Our study reveals that the combination of hypothermia + allopurinol after moderate focal HI in P10 rats decreases infarct and improves residual brain volumes at 72 h, although in males it does not provide more neuroprotection than hypothermia alone. Infarct volume at 72 h was reduced from 33.60% in the untreated group to 13.41% in HIA, 5.1% in HIH, and 3.8% in HIHA. These results are in accordance with the first reports on hypothermia in which the infarct area was reduced to about 50% when compared with the vehicle [52]. In those initial papers, no sex differences were reported.

In the same line, in our study, the hippocampal volume was better preserved in HIA, HIH, and HIHA females than in HI. Interestingly, allopurinol administration seemed to increase the neuroprotective effect in females, not only in those that received combined therapy (HIHA), but also in those females that received it without TH (HIA) when compared to HI. It is important to point out that in our study allopurinol administration was very early, less than 15 minutes after the HI injury, in order to avoid radical production, thereby simulating the situation that seems to happen when it is administered during labor ([51]. These results are also in accordance with what Nie and colleagues reported with another antioxidant therapy, N-acetylcysteine (NAC), suggesting that antioxidants may provide less neuroprotection in males [38]. Sex differences have been reported in neonatal models of hypoxic-ischaemic brain injury [53]. Additionally, in humans, male infants are more vulnerable to perinatal insult, suffering worse long-term cognitive deficits compared to females with equivalent injury [54,55,56]. Recent studies have demonstrated that mechanisms of cell death vary depending on sex [57,58].

After an HI event, morphological features of three different cell death types can be observed: necrotic, apoptotic, and autophagic cell death [59,60]. The best known cell death forms are necrosis and apoptosis, even though the importance of autophagy-mediated cell death has recently become a field of interest [61,62]. Apoptosis has been well described as a programmed delayed cell death mechanism with different intracellular signaling pathways. Complete understanding of this process represents a potential target for neuroprotective interventions.

Although there are multiple pathways to programmed cell death, caspase-3 is the final 'executioner,' and thus caspase-3 activation may be used as a reasonable marker of apoptosis. It has been demonstrated that hypothermia reduces caspase-3 expression in newborn rats [63]. In our animals, caspase-3 was increased in HI animals 24h post-injury when compared to the other groups, as has previously been demonstrated [64]. Supporting histological results, there was also a decrease in caspase-3 activity in females that received allopurinol (HIHA, HIA). Oxidant reagents can lead to the activation of caspases, triggering apoptosis [65]. Our results suggest that allopurinol administration alone or in combination with hypothermia may reduce free radical liberation, decreasing caspase activation and consequently reducing brain injury. This process, as explained above, seems to be more pronounced in females. This is in accordance with a recently published hypothesis suggesting that programmed cell death in females depends mainly on caspase activation [30], as well as on their greater sensitivity to redox status.

Regarding functional performance, we found the same tendency in histological, molecular, and learning and memory tests. Treated animals (HIA, HIH, HIHA) had better results in WMT. When this was analysed taking gender into account, female allopurinol-treated (alone or in combination with hypothermia) animals achieved better results than males, again. The functional recovery was almost complete.

Despite these data, we found no consistent results to support the idea that hypothermia + allopurinol was better than hypothermia alone. Nevertheless, it is important to point out that the effect of both treatments independently was very significant, and therefore it is quite difficult to gain even more neuroprotection, especially with so few animals.

Dual therapy has a good neuroprotection spectrum. Other outcomes and molecular issues should be evaluated to test their potential benefits when compared to hypothermia alone.

Conclusions

There is increasing evidence that neuroprotective strategies may have different effects depending on sex [29]. Our results also support this notion and, together with other published data,

invite the reasonable conclusion that gender plays an important role in the effectiveness of each therapy. Those therapies that act by inhibiting the caspase-dependent pathway would have better results in females, and even more so if they were antioxidant therapies. Therefore, it seems reasonable that to achieve better neuroprotection, several therapeutic strategies should be used, and many individual considerations such as gender should be taken into account to indicate the best therapy for each patient.

Supporting information

S1 Fig. Negative geotaxis test results. All treated groups presented better results than the HI ones. No differences in sex were detected. (TIF)

Acknowledgments

This work was supported by Bebedue to MC and by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [BFU2014-55373-R] and from the Generalitat de Catalunya [2014 SGR 1178] to SA.

The sponsor had no involvement in the collection, analysis, or interpretation of the data. We would like to thank Isabel Salas for her technical support.

Author Contributions

Conceptualization: Javier Rodríguez-Fanjul, Cristina Durán Fernández-Feijóo, Marta Camprubí Camprubí.

Data curation: Javier Rodríguez-Fanjul, Cristina Durán Fernández-Feijóo, Míriam Lopez-Abad, Rafael Balada Caballé, Soledad Alcántara-Horillo, Marta Camprubí Camprubí.

Formal analysis: Marta Camprubí Camprubí.

Funding acquisition: Marta Camprubí Camprubí.

Investigation: Javier Rodríguez-Fanjul, Míriam Lopez-Abad, Maria Goretti Lopez Ramos, Marta Camprubí Camprubí.

Methodology: Maria Goretti Lopez Ramos.

Project administration: Marta Camprubí Camprubí.

Resources: Maria Goretti Lopez Ramos.

Writing – original draft: Javier Rodríguez-Fanjul, Marta Camprubí Camprubí.

Writing – review & editing: Soledad Alcántara-Horillo, Marta Camprubí Camprubí.

References

1. Smith J, Wells L, Dodd K. The continuing fall in incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *BJOG*. 2000; 107:461–466. PMID: [10759262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10759262/)
2. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010; 86:329–338. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010> PMID: [20554402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20554402/)
3. Glass HC, Ferriero DM. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Curr Treat Options Neurol*. 2007; 9:414–423. PMID: [18173941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18173941/)
4. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med*. 2009; 361:1349–1358. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900854> PMID: [19797281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19797281/)

5. Morken TS, Brekke E, Håberg A, Widerøe M, Brubakk AM, Sonnewald U. Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. *Stroke*. 2014; 45(9): 2777–2785. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005341> PMID: 25052323
6. Perrone S, Stazzoni G, Tataranno ML, Buonocore G. New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25:83–88.
7. Chun PT, McPherson RJ, Mamey LC, Zangeneh SZ, Parsons BA, Shojaie A, et al. Serial plasma metabolites following hypoxic-ischemic encephalopathy in a nonhuman primate model. *Dev Neurosci*. 2015; 37(2): 161–171. <https://doi.org/10.1159/000370147> PMID: 25765047
8. Lee JK, Wang B, Reyes M, Armstrong JS, Kulikowicz E, Santos PT, et al. Hypothermia and rewarming activate a macroglial unfolded protein response independent of hypoxic-ischemic response independent of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal piglets. *Dev Neurosci*. 2016; 38(4):277–294. <https://doi.org/10.1159/000448585> PMID: 27622292
9. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al. Part 11: neonatal resuscitation: 2010 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Circulation*. 2010; 122:516–538.
10. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards A, Ferreiro DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005; 365:663–670. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17946-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17946-X) PMID: 15721471
11. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1574–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp050929> PMID: 16221780
12. 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
13. Sosunov SA, Ameer X, Niatsetskaya ZV, Utkina-Sosunova I, Ratner VI, Ten VS, et al. Isoflurane anesthesia initiated at the onset of reperfusion attenuates oxidative and hypoxic-ischemic brain injury. *Plos One*. 2015; 10(3).
14. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015; 100(6):F541–552. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306284> PMID: 26063194
15. Perrone S, Stazzoni G, Tataranno ML, Buonocore G. New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25:83–88.
16. Sabir H, Walloe L, Dingley J, Smith E, Liu X, Thoresen M. Combined treatment of xenon and hypothermia in newborn rats-additive or synergistic effect? *Plos One*. 2014; 6:9(10).
17. Peeters C, Van Bel F. Pharmacological reduction of post-hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Biol Neonate*. 2001; 79:274–280. PMID: 11275665
18. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res*. 1990; 27:332–336. <https://doi.org/10.1203/00006450-199004000-00003> PMID: 2342827
19. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjand DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res*. 1993; 33:405–411. <https://doi.org/10.1203/00006450-199304000-00018> PMID: 8479823
20. Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res*. 2006; 1073–1074.
21. Yamaguchi M, Okamoto K, Kusando T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, et al. The effects of xanthine oxidoreductase inhibitors on oxidative stress markers following global brain ischemia reperfusion injury in C57BL/6 mice. *Plos One*. 2015; 10(7).
22. Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, et al. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics*. 1998; 101(2):185–193. PMID: 9445490
23. Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007; 36(1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.08.005> PMID: 17162192
24. Boda D, Nemeth I, Kiss P, Orvos H. Treatment of mothers with allopurinol to produce therapeutic blood levels in newborns. *Prenatal Neonatal Med*. 1999; 4(2):130–134.
25. Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, Derks JB, Groenendaal F, Rijken M, 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):162–166.
26. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; 16: CD006817.

27. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 7: CDC006817.
28. Kaandorp JJ, Benders MJ, Rademaker CM, Torrance HL, Oudijk MA, de Haan TR, et al. Antenatal allopurinol for reduction of birth asphyxia induced brain damage (ALLO-Trial); a randomized double blind placebo controlled multicenter study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2010; 10:8. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-10-8> PMID: 20167117
29. Hill CA, Fitch RH. Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice. *Neurol Res Int*. 2012; 2012:867531.
30. Netto CA, Sanches E, Odorczyk FK, Duran-Carabali LE, Weis SN. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J Neuroscience Research*. 2017 95:409–421.
31. Zhu C, Xu F, Wnag X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, et al. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 2006; 96(4): 1016–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03639.x> PMID: 16412092
32. Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res*. 2005; 157(1): 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019> PMID: 15617782
33. Morris R. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47–60. PMID: 6471907
34. Nie X, Lowe DW, Rollins LG, Bentzley J, Fraser JL, Martin R. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neurosci Res*. 2016; 108: 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.008> PMID: 26851769
35. Drury PP, Gunn ER, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clin Perinatol*. 2014; 41:161–175. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.10.005> PMID: 24524453
36. Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Muche R, Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of the EURO-network RCT. *Pediatrics*. 2010; 126, 771–778.
37. 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. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.139> PMID: 23085819
38. 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. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.138> PMID: 23085817
39. Garberg HT, Huun MU, Escobar J, Martinez-Orgado J, Löberg EM, Solberg R, Saugstad OD. Short-term effects of cannabidiol after global hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Pediatr Res*. 2016; 80(5): 710–718. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.149> PMID: 27441365
40. Zhang Q, Lan Y, He XF, Luo CM, Wang QM, Liang FY, et al. Allopurinol protects against ischemic insults in a mouse model of cortical microinfarction. *Brain Res*. 2015; 1622:361–367. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.010> PMID: 26187758
41. Smit E, Liu X, Gill H, Jary S, Wood T, Thoresen M. The effect of resuscitation in 100% oxygen on brain injury in a newborn rat model of severe hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Resuscitation*. 2015; 96:214–219. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2015.07.050> PMID: 26300234
42. Aspberg A, Totmar O. Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture of fetal brain cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992; 66(1):55–58. PMID: 1600632
43. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZA, Täuber MG, et al. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res*. 2004; 56:656–662. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000139413.27864.50> PMID: 15295091
44. Perlman JM. Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury. *J Perinatol*. 2007; 27:39–46.
45. Li Y, Cao TT, Guo S, Zhong Q, Li CH, Li Y, et al. Discovery of novel allopurinol derivatives with anticancer activity and attenuated xanthine oxidase inhibition. *Molecules*. 2016; 21(6).
46. Zhang Z, Blake DR, Stevens CR, Kanczler JM, Winyard PG, Symons MC, Benboubetra M, Harrison R. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Radic Res*. 1998; 28(2): 151–164. PMID: 9645392
47. Sanders SA, Massey V. The thermodynamics of xanthine oxidoreductase catalysis. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(3):371–379. <https://doi.org/10.1089/ars.1999.1.3-371> PMID: 11229448
48. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G, et al. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. 2003; 54:516–522. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000081297.53793.C6> PMID: 12815112

49. Benders M, Bos AF, Rademaker CM, Rijken M, Torrance HL, Groenendall F, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006; 91:163–165.
50. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CM, Bos AF, Van Den Berg P, et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics.* 2009; 124:350–357. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2228> PMID: 19564319
51. Kaandorp JJ, Benders MJ, Schuit E, Rademaker CM, Oudijk MA, Porath MM, et al. Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: a novel neuroprotective intervention? A multicentre randomized placebo controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015; 100(3):F216–F223. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306769> PMID: 25512466
52. Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res.* 1993; 34(4):525–529. <https://doi.org/10.1203/00006450-199310000-00029> PMID: 8255688
53. Hurn PD, Vannucci SJ, Hagberg H. Adult or perinatal brain injury: does sex matter? *Stroke.* 2005; 36(2):193–195. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000153064.41332.f6> PMID: 15625289
54. Mayoral SR, Omar G, Penn AA. Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res.* 2009; 66(3):248–253. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181b1bc34> PMID: 19542909
55. Smith AL, Alexander M, Rosenkrantz TS, Sadek ML, Fitch RH. Sex difference in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 2014; 254:54–67.
56. Huang HZ, Wen XH, Liu H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Neurosci.* 2016; 126(7):647–657. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1047016> PMID: 26289716
57. Sharma J, Johnston MV, Hossain MA. Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BMC Neurosci.* 2014; 15:9.
58. Chavez-Valdez R, Martin LJ, Razdan S, Gauda EB, Northington FJ. Sexual dimorphism in BDNF signaling after neonatal hypoxia-ischemia and treatment with necrostatin-1. *Neuroscience.* 2014; 260:106–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.023> PMID: 24361177
59. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol.* 2009; 36(4):835–838. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2009.07.011> PMID: 19944838
60. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011; 69(5):743–758. <https://doi.org/10.1002/ana.22419> PMID: 21520238
61. Descloux C, Ginet V, Clarke PG, Puyal J, Truttman AC. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci.* 2015; 45:75–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.06.008> PMID: 26225751
62. Roux C, Aligny C, Lesuer C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y, et al. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. *Exp Neurol.* 2015; 267:177–193. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.037> PMID: 25795167
63. Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr B, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate* 2001; 79:172–179. PMID: 11275647
64. Lai YC, Pan KT, Chang GF, Hsu CH, Khoo KH, Hung CH, et al. Nitrite-mediated S-nitrosylation of caspase-3 prevents hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction. *Circ Res.* 2011; 109:1375–1386. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256479> PMID: 22021929
65. Zhao P, Zhou R, Li HN, Yao WX, Qiao HQ, Wang SJ, et al. Oxymartine attenuated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via improving antioxidant enzyme activities and inhibiting cell death. *Neurochem Int.* 2015; 89:17–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.06.008> PMID: 26120022