



Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud Carrera de Medicina

**Año 2023
Trabajo Final de Carrera (Tesis)**

**Efecto neuroprotector *in vivo* del Enriquecimiento
Ambiental en el cerebelo murino en un modelo de asfixia
perinatal**

**Neuroprotective effect of Environmental Enrichment on
the cerebellum in a murine model of perinatal asphyxia.**

Alumno:

Meloni Camila

ORCID: <https://orcid.org/000-0002-2566-29380>

Camila.meloni@alumnos.uai.edu.ar

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud - Universidad Abierta Interamericana

Tutor:

Capani Francisco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0342-0628>

franciscocapani@hotmail.com

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud - Universidad Abierta Interamericana

Efecto neuroprotector *in vivo* del Enriquecimiento Ambiental en el cerebelo murino en un modelo de asfixia perinatal.

Neuroprotective effect of Environmental Enrichment on the cerebellum in a murine model of perinatal asphyxia.

Autores: Camila Meloni, Francisco Capani.

Resumen

Introducción: la asfixia perinatal (AP) es el cuadro clínico que se presenta después de una insuficiencia en el intercambio de gases debido a una interrupción del flujo placentario durante el embarazo o las primeras horas del parto. La AP es un factor de riesgo para numerosos trastornos neurológicos y del neurodesarrollo. No existe una terapéutica eficaz para revertir los efectos producidos por esta injuria. En este trabajo se estudió el grado de neuroprotección sobre el cerebelo utilizando un tratamiento consistente en un ambiente enriquecido que ha demostrado producir efectos beneficiosos en casos de asfixia perinatal. **Material y métodos:** se utilizó el modelo de asfixia perinatal por inmersión. Posteriormente los animales fueron colocados en jaulas con ambiente enriquecido. Se realizaron pruebas de conducta dentro de los primeros 21 días de vida y concluidas estas pruebas se realizaron análisis morfológicos del cerebro.

Palabras Clave: Perinatal asphyxia; neuroprotection; cerebellum; enriched environment.

INTRODUCCIÓN

La asfixia perinatal (AP) es el cuadro clínico que se presenta después de una insuficiencia en el intercambio de los gases respiratorios, durante el embarazo o en las primeras horas del parto (1 y 2 estadio del parto), debido a una interrupción del flujo placentario, si es persistente redundando en una disminución de la PO_2 , un aumento de la PCO_2 , disminución del pH sanguíneo y caída del exceso de bases.(1).

Se habla de asfixia perinatal porque ésta puede ocurrir: antes del nacimiento, durante el embarazo, el trabajo de parto y el parto (2).

Las causas de asfixia perinatal pueden ser maternas como la hemorragia en el tercer trimestre, las infecciones (sepsis, corionamnionitis), anemia, collagenopatías; obstétricas como trabajo de parto prolongado, rotura prematura de membranas, líquido amniótico meconial, oligoamnios o polihidramnios.(3).(4), placenta previa, desprendimiento prematuro de placenta, alteraciones de la contractilidad uterina (hipotonía uterina, hipertonia uterina); y/o fetales como alteraciones de la frecuencia cardíaca fetal (bradicardia, taquicardia), retardo del crecimiento intrauterino, prematuridad, bajo peso, macrosomía fetal, malformaciones congénitas, eritroblastosis fetal, fetos múltiples.

Se estima en diversos países que entre 2 y 4 de cada 1.000 recién nacidos de término sufren hipoxia antes o durante el parto.

Aproximadamente entre el 15 y el 20% de ellos fallecen en el periodo neonatal (cifra que alcanza el 60% en prematuros). A pesar de que los tratamientos de soporte y los cuidados durante la etapa perinatal han permitido disminuir la mortalidad en las últimas décadas, se produjo un aumento de la morbilidad de los sobrevivientes, con un 25% de casos de déficit neurológico(1,5). La consecuencia clínica más significativa de la AP es la encefalopatía hipóxico-isquémica. Se sabe que en el recién nacido a término las células más vulnerables son las que maduran y se diferencian más rápido: neuronas de los ganglios basales y tálamo, tronco cerebral, hipocampo y regiones perirrolándicas y visuales de la neocorteza (1). La AP es también un factor de riesgo para numerosos trastornos neurológicos y mentales (6), incluyendo discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, epilepsia (7), esquizofrenia (8) y trastornos neurodegenerativos. La AP ha sido estudiada los últimos 30 años utilizando un modelo experimental en ratas (9) que simula la asfixia intrauterina induciendo la AP el día del parto por inmersión de los neonatos en agua. Este modelo es muy utilizado en investigación permitiendo dilucidar que el cerebelo, las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, el cuerpo estriado, las capas II, III y VI de la corteza cerebral y la retina son algunas de las áreas del sistema nervioso central (SNC) que muestran mayor vulnerabilidad ante este tipo de injuria (10,11).

El cerebelo es un órgano motor ubicado en la fosa posterior. Es el encargado de la coordinación de inicio y modulación de los movimientos voluntarios, de la regulación del tono muscular y del control de la postura y la marcha. Se encuentra dividido anatómicamente en dos hemisferios, una región central denominada vermis y puede subdividirse en lóbulos tanto a nivel funcional como filogenético. Se encuentra conectado con el tallo cerebral a través de los pedúnculos cerebelosos y tiene estrecha relación con el sistema vestibular y los tractos sensitivos ascendentes desde la medula espinal. Se encuentra irrigado principalmente por tres arterias de forma bilateral, provenientes del sistema vertebrobasilar.

La corteza cerebelosa está dividida en tres capas: la más superficial o capa molecular, la capa intermedia o células de Purkinje y la capa más profunda o capa granular. En estas capas se encuentran 5 tipos celulares: células granulares con sinapsis excitatorias, células de Purkinje, células en cesto, estrelladas y de Golgi, las cuales tienen un sistema de sinapsis inhibitoria. Los núcleos cerebelosos se encuentran localizados en la sustancia blanca central. En el corte transversal se ponen en evidencia los núcleos profundos de sustancia gris embebidos entre la sustancia blanca del cerebelo. De medial a lateral se encuentra el núcleo fastigio ubicado en el techo del cuarto ventrículo, que se encarga del control antigravitatorio, la postura y el equilibrio; el núcleo interpuesto, el cual incluye el núcleo globoso y emboliforme que reciben aferencias de la corteza cerebral y de la medula espinal a través del tracto espinocerebeloso, y finalmente el núcleo dentado que recibe aferencias de la corteza premotora y motora complementaria para la coordinación del inicio de los movimientos voluntarios y destreza fina (12).

Como consecuencia de la AP, la alteración primaria del desarrollo del cerebelo más frecuente ha consistido en déficits bilaterales, simétricos, de los volúmenes de los hemisferios cerebelosos. El resultado sería una alteración en la proliferación, migración y organización celular. A su vez afecta el desarrollo neurológico provocando hipotonía, incoordinación motora fina y ataxia, entre otros (13).

Hasta la fecha no hay ninguna estrategia terapéutica efectiva que pueda contrarrestar las alteraciones provocadas por la AP, aunque el método más utilizado y estudiado es la hipotermia selectiva craneal o corporal total a recién nacidos, logrando reducción de la mortalidad y las secuelas a largo plazo (1,14)

Dentro de los tratamientos neuroprotectores en los casos de AP que se han probado en los últimos años, se encuentra la melatonina (15), la eritropoyetina (15), las células madre (16) y la palmitoiletanolamida (PEA) (17,18), todos ellos en modelos animales. Desde 2010 se están realizando tratamientos combinados, de dos o más estrategias terapéuticas (19), logrando resultados satisfactorios parciales. Por ejemplo, se han combinado hipotermia terapéutica con melatonina y células madre, que mostraron efectos beneficiosos, pero no los efectos sinérgicos esperados.

El enriquecimiento ambiental (EA) para los animales es una combinación de estimulación inanimada y social compleja, y generalmente consiste en condiciones de alojamiento que facilitan una estimulación sensorial, cognitiva, motora y social en relación con las condiciones de alojamiento estándar. Los animales se encuentran bajo una exposición continua a tareas de aprendizaje, las jaulas son más grandes con paredes de alambre para que puedan trepar y con distintos objetos como juguetes, ruedas, tubos plásticos, rampas inclinadas, cadenas colgando del techo (20)(21).

Se considera el EA un paradigma experimental clave para descifrar como las interacciones entre genes y entorno modifican la estructura y función del cerebro a lo largo de la vida de un animal. Se puede considerar el EA no solo como una fuente externa de estímulos que da forma a los patrones de plasticidad cerebral y funcionamiento(20).

Se ha estudiado al EA como neuroprotector contra la AP (22) demostrando también efectos beneficiosos en modelos experimentales de trastorno del espectro autista (7), enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (22).

Este trabajo tuvo como objeto evaluar los efectos neuroprotectores tempranos sobre el cerebelo con el uso de AE en ratas de 21 días sometidas a AP severa.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se recibieron 10 ratas preñadas (madres n=10) 1 semana antes de la fecha probable de parto, de la cepa Sprague Dawley, del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Inicialmente fueron alojadas de a dos animales por jaulas para disminuir el estrés, y un día antes del parto fueron separadas en jaulas individuales.

Las condiciones de temperatura y humedad fueron 22 ± 2 °C y $65 \pm 5\%$ respectivamente. Se empleo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12, comenzando el periodo de luz a las 7am. Se les proporcionó alimento balanceado y agua natural ad libitum.

46 neonatos se utilizaron en el estudio.

A fin de minimizar el sufrimiento de los animales, todos los experimentos descriptos a continuación se llevaron a cabo de acuerdo con los principios que establece la Guía para el Cuidado y el Uso de animales de Laboratorio.

INDUCCION AP

Se utilizo el modelo de AP de Bjelke y colaboradores modificado en el laboratorio(23,24). Se anestesió a la madre con Ketamina 100 mg/kg y luego se eutanasió por decapitación con guillotina, después mediante una incisión abdominal se aislaron los cuernos uterinos y se

sumergieron en agua a 37°C por 19 minutos para inducir una asfixia severa en las crías. Se retiraron de los cuernos y se les realizó estimulación manual hasta que se restableció la respiración regular, se ligó el cordón umbilical de cada cría y se las colocó bajo una fuente de calor hasta que recuperaron la temperatura. Luego, se realizó el sexado para identificar las crías macho, se descartaron las hembras para evitar el efecto neuroprotector de los estrógenos(25).

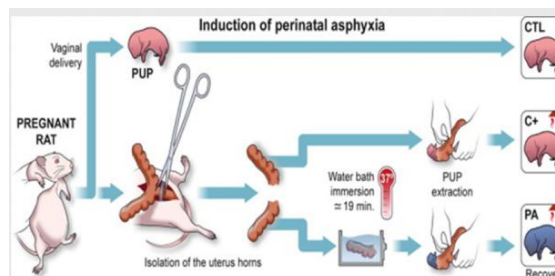


Figura 1. Modelo de inducción a AP

Los grupos control fueron crías macho nacidas por parto vaginal y para los animales AP se utilizaron madres sustitutas a las cuales se les cambiaron las crías macho por las nacidas por cesárea sometidas a la injuria de AP.

PROTOCOLO DE NEUROPROTECCION

Una vez que las crías macho mejoraron sus condiciones fisiológicas, fueron alojadas con madres sustitutas. Se establecieron 4 grupos experimentales: ratas nacidas vía vaginal (control CTL + AE) (n=10), ratas nacidas vía vaginal (CTL) alojadas en jaula estándar (n=7), ratas AP + AE (n=14), ratas AP alojadas en jaula estándar (n=15).

Fueron alojados los primeros 21 días en jaulas de ambiente enriquecido de 61 (an) x 112 (l) x 41 (al) que incluían diversos materiales de anidación (tiras de papel, algodón, viruta), túneles, bloques de madera, juguetes comerciales de plástico y ruedas de ejercicio que se intercambiaron 2 veces por semana para favorecer la curiosidad (figura 2).



Figura 2. A. Jaula de grandes dimensiones con elementos utilizados como parte del enriquecimiento ambiental. B. Animales de 15 días de edad correspondientes al grupo control con la numeración identificatoria de cada individuo experimental.

EVALUACION DEL NEURODESARROLLO

Durante los primeros 21 días postnatales, se controló el peso de cada animal y se les realizó una serie de pruebas del neurodesarrollo para medir la aparición de ciertos reflejos y signos que indican la maduración del sistema nervioso(26). Estas pruebas se realizaron en una sala de comportamiento aislada entre las 8 h y las 15 h.

Las pruebas realizadas fueron:

- **Apertura de ojos:** se registra el día en que la rata tiene los dos ojos abiertos.
- **Reflejo sensorial en el ojo:** se registra el primer día en que se contrae el ojo de la rata al tocarlo con un hisopo.
- **Reflejo de enderezamiento en el aire:** se registra el primer día en que la rata cae en cuatro patas al ser arrojada boca abajo desde una altura de 50 cm sobre un algodón.
- **Reflejo de colocación de extremidades:** se registra el primer día en que la rata coloca las patas sobre la mesa tras tocar la parte posterior de las mismas con el borde de la mesa mientras el animal se encuentra suspendido.
- **Reflejo de agarre de extremidades:** se registra el primer día en que la rata se agarra a una varilla al tocar sus extremidades con la misma, mientras el animal está suspendido.
- **Reflejo de marcha:** se coloca al animal en el centro de un círculo de 13cm de diámetro y se registra el día que comienzan a moverse fuera del círculo con ambos miembros superiores. Desde el día de la aparición, registrar

diariamente el tiempo en segundos para moverse en el círculo.

- **Reflejo de sobresalto auditivo:** se registra el primer día de respuesta de sobresalto ante un aplauso fuerte.

INMUNOHISTOQUIMICA

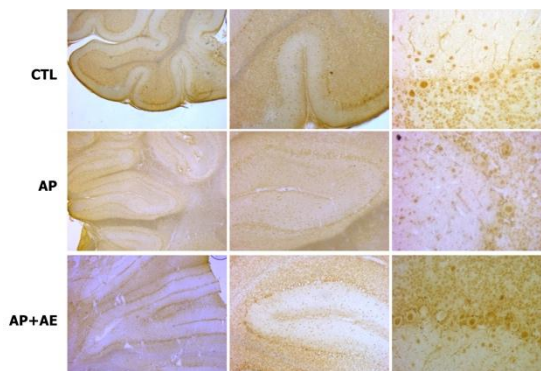


Figura 3: Micrografía del cerebelo para el marcador neurofilamento donde se observa a distintos aumentos las zonas analizadas

En el día postnatal 21, las ratas fueron anestesiadas (Ketamina 100mg/kg + Xilacina 5mg/kg) y perfundidos con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, MO, USA)(10). Se extrajo el cerebro que será post-fijado durante 2 horas en el mismo fijador. Luego se obtuvieron secciones coronales de cerebro usando Vibrátomo (Oxford). Se utilizaron los siguientes marcadores de daño neuronal y respuesta glial: neurofilamentos fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M), proteínas asociadas a los microtúbulos 2 (MAP-2) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las secciones fueron bloqueadas con suero normal de bovino al 3% (Invitrogen, CA, USA) durante 60 minutos y luego son incubadas a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios. Subsecuentemente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidada (1:500; Vector Laboratories Inc., CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio óptico (Laborlux S, Leitz) y programa de tratamiento de imágenes (Adobe Photoshop 11.0 CSA). Una vez convertidas las imágenes de color a escala de grises, se calculó el porcentaje de área reactiva para pNF-H/M y MAP-2 utilizando el programa ImageJ (versión 1.410.), y el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP se estimó manualmente.

ANALISIS ESTADISTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con las condiciones de nacimiento (CTL y AP) y alojamiento (ST y AE) como los factores principales, así como el análisis de su interacción,

para los reflejos oculares, reflejo de aparición de marcha, reflejo de agarre de extremidades, reflejo de enderezamiento en el aire, reflejo de colocación de extremidades y reflejo de sobresalto auditivo. En el caso de la evolución del peso de los animales y la latencia del reflejo de marcha, se realizó ANOVA de dos vías, con las condiciones de cada grupo (CTL-AE, CTL-ST, AP-AE, AP-ST) y día postnatal (P1 o P11, respectivamente, a P21) como factores principales y se analizó su interacción. Se trató de un ANOVA mixto, de medidas repetidas, ya que el peso y la marcha se midió en cada día postnatal para cada animal.

Las diferencias con una probabilidad del 5% o menos se consideraron significativas. Los resultados se expresaron como medias $\pm$ SEM. La distribución normal y la igualdad de varianzas se verificaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Se utilizó el análisis post hoc de Tukey.

RESULTADOS

Evaluación de marcadores de neurodegeneración de la corteza cerebelosa

Con el objetivo de evaluar los cambios histológicos y citológicos neuronales y la reacción glial en la corteza cerebelosa, analizamos el cerebelo de ratas de 21 días sometidas a AP. Se evaluaron las diferentes estructuras de la corteza cerebelosa de 1 animal de cada grupo, control (CTL), control y AE (CTL+AE), PA y PA+AE. Las imágenes representativas para los marcadores neurofilamento y GFAP se observan en las figuras 3 y 4.

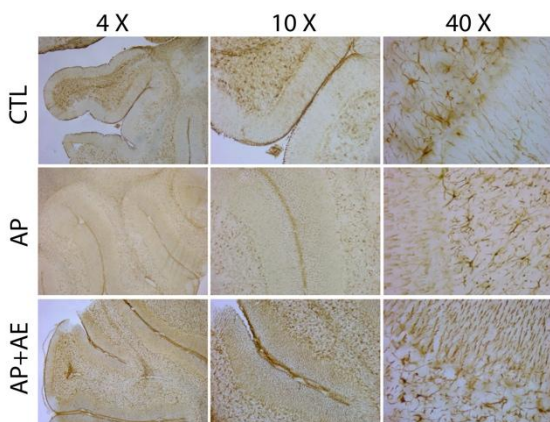


Figura 4: Micrografía del cerebelo para el marcador neurofilamento donde se observa a distintos aumentos las zonas analizadas

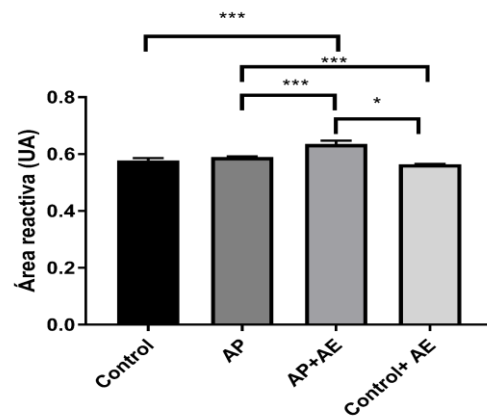


Figura 5: Medición del área reactiva para GFAP.

Los neurofilamentos (NF) son estructuras claves en la formación del citoesqueleto neuronal y del neuropilo circundante. Los neurofilamentos que por su organización bioquímica son filamentos intermedios se encuentran concentrados en el axón permitiendo la preservación de su estructura fundamental para la conformación de la sinapsis (25,27). En muchas patologías neurodegenerativas se encuentran acumuladas de manera anormal. La asfixia perinatal no es excepción como fue descrito en este laboratorio en estriado (25,27) y en el cerebelo (28). En cerebelo asfíctico se puede observar una acumulación de NF rodeando el citoplasma celular (Fig. 3). Estas estructuras también presentaron una inmuno marcación positiva en algunos axones que proyectan a la capa granulosa donde se encuentra la salida del axón de las células de Purkinje. Asimismo, algunos axones correspondientes a la capa granular se encuentran marcados en la capa molecular, que podrían hacer sinapsis con el árbol dendrítico de la célula de Purkinje. La reacción astrogliar es típica de un proceso hipóxico isquémico. El cerebelo, que es una de las áreas del sistema nervioso central afectada por la asfixia perinatal, no escapa a este tipo de respuesta celular. El cerebelo tiene una corteza trilaminar que desde la superficie hacia la profundidad comprende la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granulosa. Todas las capas muestran una amplia distribución astrocitaria como se puede observar en la figura 4 en tejido con inmunomarcación para GFAP. En la figura 4 se muestra con mayor detalle que la capa molecular presenta una fina inmunotinción para las fibras astrocitarias. En la capa de células de Purkinje se evidencia la presencia de los cuerpos astrocitarios con sus prolongaciones. Asimismo, al observar la capa molecular se puede observar que la inmunoreactividad es mayor en el tejido cerebeloso que fue sometido a AP que en el control (Fig. 4).

Se analizó el área reactiva para cuantificar el grado de positividad para el marcador GFAP. Para ello se realizaron al menos 50 mediciones en cada fotografía (5 fotografías por cerebelo) (Fig. 5). Además, el estudio de la morfología de los astrocitos mediante inmunotinción con GFAP

mostró un aumento del área positiva para GFAP en la capa molecular de la corteza cerebelosa ($p < 0,001$, Fig. 5).

Evolución del peso de los animales

El siguiente gráfico muestra que en la evolución del peso de los animales a través de un ANOVA de dos vías mixto, con medidas repetidas intersujeto, tanto los factores principales: grupo ($F_{(3)} 37.27$; $p = .000$) y día postnatal ($F_{(20)} 2671.23$; $p = .000$) fueron significativos, como así también su interacción ($F_{(60)} 42.78$; $p = .000$). La media de peso en gramos de los animales del grupo CTL-AE fue de 23.05, la del grupo CTL-ST de 17.17, la del grupo AP-AE de 24.29 y la del grupo AP-ST de 28.53. Este análisis cumple con la prueba de esfericidad de Mauchly ($p = .000$; Greenhouse-Geiser = .149). El análisis post-hoc de Tukey mostró una diferencia de medias significativa en la interacción entre todos los grupos ($p = .000$ en todos los casos) excepto entre los grupos AP-AE y CTL-AE ($p = .481$). (Figura 6)

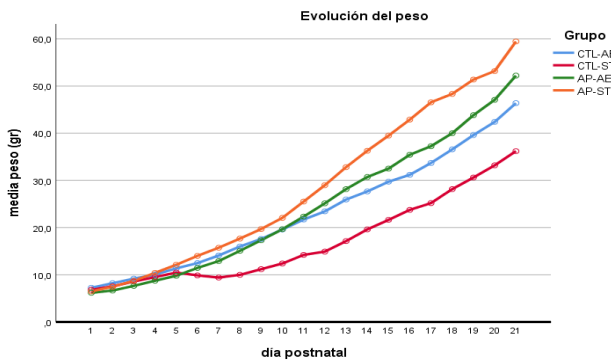


Figura 6. Curvas de evolución del peso de los animales en gramos, en los distintos grupos, desde el P1 al P21, calculado según análisis de varianza (ANOVA) de dos vías mixto de medidas repetidas intersujeto, seguido del análisis post hoc de Tukey.

Apertura y reflejo sensorial oculares

Como puede apreciarse en el siguiente gráfico, el ANOVA de dos vías reveló que el factor alojamiento ($F_{(1)} = 7.37$; $p = .010$) así como la interacción entre alojamiento y nacimiento ($F_{(1)} = 10.29$; $p = .003$) resultaron significativos, pero no sucedió lo mismo en el factor nacimiento ($F_{(1)} = .002$; $p = .961$), en la apertura y la aparición del reflejo sensorial del ojo. El análisis post-hoc de Tukey reveló que existen diferencias significativas entre los grupos CTL-ST y CTL-AE, y en este caso el grupo CTL con alojamiento AE obtuvo un mejor desempeño en este reflejo. Ahora bien, en el caso de los grupos AP también hubo una diferencia a favor de los animales en jaulas AE, pero esta no alcanzó a ser estadísticamente significativa. (Figura 7).

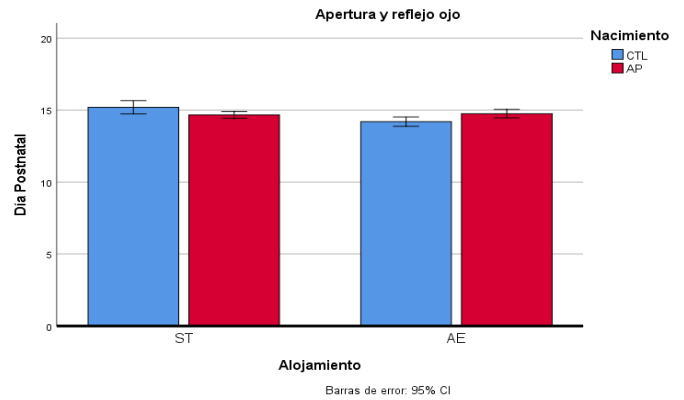


Figura 7. Día de apertura ocular y aparición del reflejo sensorial según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Reflejo de agarre de extremidades

En la siguiente figura se muestra que el análisis estadístico ANOVA de dos vías reveló que en el reflejo de agarre de extremidades no resultaron significativos el factor nacimiento ($F_{(1)} = 2.10$; $p = .15$) ni el factor alojamiento ($F_{(1)} = .25$; $p = .61$) tomados aisladamente pero sí resultó significativa su interacción ($F_{(1)} = 14.04$; $p = .001$). El análisis post-hoc de Tukey reveló la existencia de diferencias significativas entre los grupos CTL-ST y AP-ST ($p = .009$) y los grupos AP-AE y AP-ST ($p = .002$). (Figura 8)

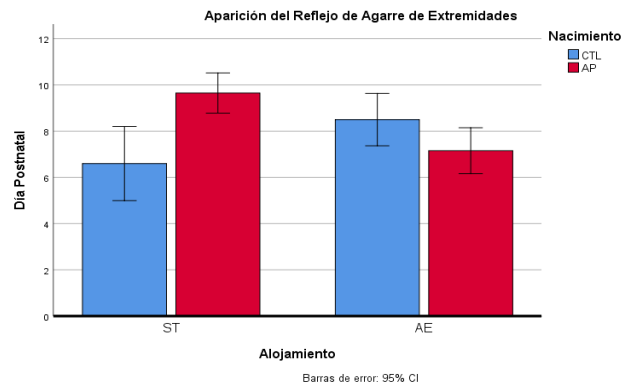


Figura 8. Día de aparición del reflejo de agarre de extremidades según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Reflejo de enderezamiento en el aire

En la figura a continuación, se muestra que el análisis estadístico ANOVA bifactorial reveló que el factor nacimiento ($F_{(1)} = 50.81$; $p = .00$) y la interacción entre nacimiento y alojamiento ($F_{(1)} = 4.92$; $p = .032$) resultaron significativos, sucediendo lo contrario con el factor alojamiento ($F_{(1)} = 2.85$; $p = .099$).

En el análisis post-hoc de Tukey resultaron significativas las interacciones entre los siguientes grupos: CTL-AE y AP-AE ($p = .003$), CTL-AE y AP-ST ($p = .000$), CTL-ST y AP-AE ($p = .008$), CTL-ST y AP-ST ($p = .000$), AP-AE y AP-ST ($p = .006$). (Figura 9)

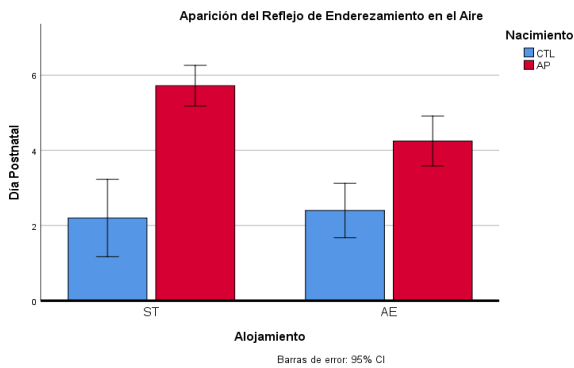


Figura 9. Día de aparición del reflejo de enderezamiento en el aire según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Reflejo de sobresalto auditivo

En la figura a continuación se muestra que el análisis estadístico ANOVA de dos vías reveló que los factores nacimiento ($F_{(1)} = .02$; $p = .87$) y alojamiento ($F_{(1)} = .67$; $p = .41$) no resultaron significativos tomados aisladamente, pero sí resultó significativa su interacción ($F_{(1)} = 2.39$; $p = .13$). En cuanto al análisis post-hoc de Tukey, este reveló que no existieron interacciones significativas entre ninguno de los grupos. (Figura 10)

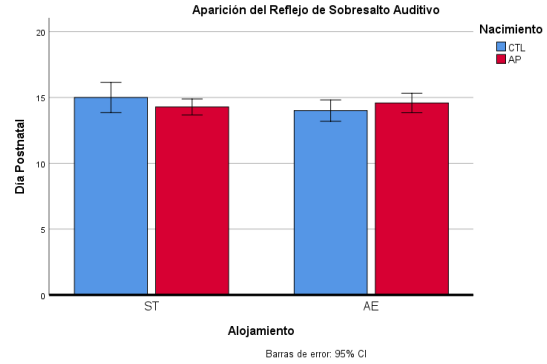


Figura 10. Día de aparición del reflejo de sobresalto auditivo según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Reflejo de colocación de extremidades

En la siguiente figura se muestra que el análisis estadístico ANOVA de dos vías reveló en el reflejo de colocación de extremidades no es significativo el factor nacimiento ($F_{(1)} = .23$; $p = .63$) mientras que sí resultaron significativos el factor alojamiento ($F_{(1)} = 18.34$; $p = .000$) y la interacción entre ambos factores ($F_{(1)} = 15.05$; $p = .000$). Con respecto al análisis post-hoc de Tukey, este señaló que entre los grupos CTL-AE y AP-AE hay diferencias significativas ($p = .009$), al igual que entre los grupos CTL-AE y AP-ST ($p = .014$). También existen diferencias significativas entre los grupos CTL-ST y AP-AE ($p = .025$) al igual que entre los grupos AP-AE y AP-ST ($p = .000$). (Figura 11)

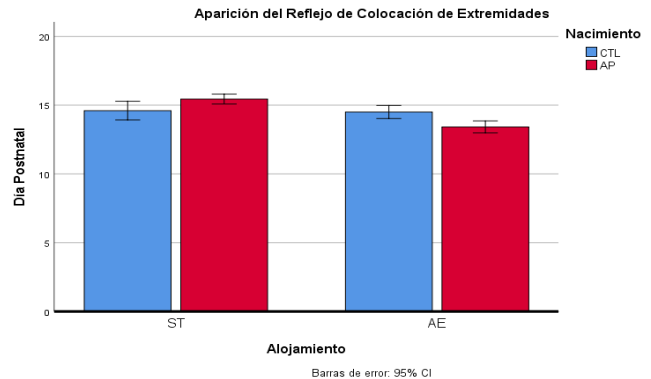


Figura 11. Día de aparición del reflejo de colocación de extremidades según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Reflejo de marcha

En la siguiente figura se observa que el análisis estadístico ANOVA de dos vías indica que en la aparición del reflejo de marcha el factor alojamiento resultó significativo ($F_{(1)} =$

14.05; $p = .03$), mientras que no lo hicieron el factor nacimiento ($F_{(1)} = 1.26$; $p = .26$) y la interacción entre ambos factores ($F_{(1)} = 2.29$; $p = .13$). El análisis post-hoc de Tukey reveló que la interacción entre los grupos CTL-AE y AP-ST resultó significativa ($p = .03$), al igual que la interacción entre los grupos AP-AE y AP-ST ($p = .10$).

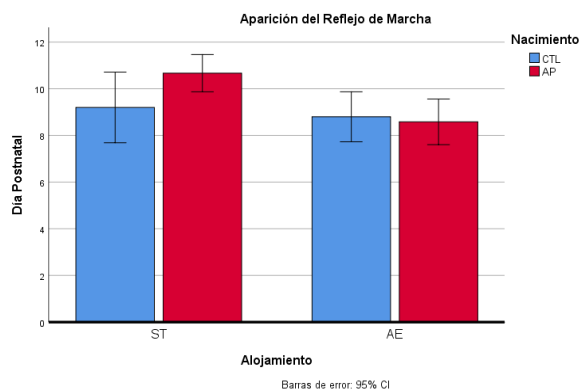


Figura 12. Día de aparición del reflejo de marcha según nacimiento y alojamiento. Las barras y las barras de error representan la media $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido del análisis post hoc de Tukey.

Con respecto a la latencia del reflejo de marcha, el gráfico a continuación muestra que el ANOVA de dos vías mixto, de medidas repetidas intersujeto, indicó que tanto los factores principales: grupo ($F_{(3)} 5.92$; $p = .003$) y día postnatal ($F_{(10)} 21.07$; $p = .000$) fueron significativos, como así también su interacción ($F_{(30)} 207.05$; $p = .000$). Este análisis cumple con la prueba de esfericidad de Mauchly ($p = .000$; Greenhouse-Geisser = .511). El análisis post-hoc de Tukey mostró diferencias de medias significativas en la interacción entre los grupos CTL-AE y AP-ST ($p = .036$), y entre los grupos AP-AE y AP-ST ($p = .017$). (Figura 12).

DISCUSIÓN

En este estudio se evidencia que la AP produce un retraso en el neurodesarrollo y que el tratamiento temprano con AE es parcialmente eficaz en esta patología (21,26). Estas observaciones concuerdan con estudios previos donde utilizaron el AE como neuroprotector en casos de AP y otras enfermedades neurodegenerativas(7).

Entre los parámetros físicos se puede observar que los animales alojados en AE obtuvieron un peso por debajo de las ratas alojadas en jaula estándar, aunque se mantuvieron en un peso saludable. Investigaciones previas han señalado que las ratas, especialmente las machos, alojadas en AE tienden a disminuir de peso, lo cual puede deberse al ejercicio físico realizado (26).

No se encontraron diferencias significativas en la prueba de sobresalto auditivo entre los animales mantenidos en jaula estándar o en jaula de AE, lo cual en parte podría

explicarse por la ausencia de estímulos auditivos en el protocolo de AE utilizado. En futuros estudios, deberían incluirse este tipo de estímulos para poder evaluar si se produce alguna diferencia en este sentido.

En cuanto a la latencia del reflejo de marcha, se evidencia un retraso en el grupo AP alojado en jaula estándar, pero existe una variabilidad intragrupo muy marcada, que puede deberse al n pequeño de los grupos o al estrés que podrían haber influenciado a los animales en el momento de la prueba, por lo que debería repetirse para comparar resultados.

Con respecto a la aparición de los reflejos de colocación de extremidades y de marcha, el AE logró revertir los efectos perniciosos de la AP, superando incluso a los grupos controles. Se destaca que estos reflejos son los más relacionados a las funciones propias del cerebelo, lo que parecería indicar que este área del cerebro es una de las más beneficiadas por el AE, aunque se necesitan mayor cantidad de estudios, especialmente morfológicos y bioquímicos, para profundizar en esta cuestión (13).

En cuanto a la apertura y reflejo ocular, el reflejo de agarre de extremidades y el reflejo de enderezamiento en el aire, se puede observar que hubo un retraso en la aparición de los mismos en los animales asfícticos alojados en jaula estándar, lo cual resalta los efectos deletéreos de la AP. Si bien en los animales alojados en AE hay una mejoría en los reflejos antes mencionados, no se llega a revertir totalmente la injuria causada por la AP. Estos resultados apoyan la hipótesis acerca de la necesidad de evaluar el uso de agentes neuroprotectores combinados, por ejemplo utilizar AE junto con Palmitoiletanolamida, Melatonina, estrógenos, entre otros, que ya han evidenciado tener efectos beneficiosos pero parciales en AP, por lo que su combinación tal vez podría lograr un efecto sinérgico (17,29).

Finalmente, sería interesante en el futuro realizar experimentos de EA en casos de AP no sólo a corto plazo, como en la presente investigación, sino también a mediano y largo plazo (por ejemplo, en el P30, P60, P120). En estas etapas del desarrollo puede evaluarse de forma más completa el desarrollo del sistema nervioso (no sólo a través de los reflejos). También, al llevarse a cabo un alojamiento más prolongado con AE, los animales podrían verse más beneficiados por el mismo, ya que se observó que las crías en las dos primeras semanas de vida, por su falta de desarrollo, hacían un uso muy escaso de los elementos incluidos en el AE.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

1. Meneghello, P. Pediatría [Internet]. [citado 5 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.medicapamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9789500606318?token=7530b075-d434-43a8-a193-14c13cf917ad#{%22Pagina%22:%22362%22,%22Vista%22:%22Indice%22,%22Busqueda%22:%22%22}>
2. Vizcaíno LYM. Algunos factores neonatales relacionados con la depresión al nacer. Hospital Ginecoobstétrico de Guanabacoa, 2009.
3. Delfino A, Weinberger M, Delucchi G, Filgueira L, Giró N, Grajales MI, et al. Seguimiento de recién nacidos con asfixia perinatal. Arch Pediatría Urug.
4. san14314.pdf [Internet]. [citado 12 de enero de 2023]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v18n3/san14314.pdf>
5. Holubiec MI, Romero JI, Blanco E, Tornatore TL, Suarez J, Rodríguez de Fonseca F, et al. Acylethanolamides and endocannabinoid signaling system in dorsal striatum of rats exposed to perinatal asphyxia. Neurosci Lett. julio de 2017;653:269-75.
6. Herrera-Marschitz M, Neira-Pena T, Rojas-Mancilla E, Espina-Marchant P, Esmar D, Perez R, et al. Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. Front Neurosci. 26 de marzo de 2014;8:47.
7. Perna R, Cooper D. Perinatal Cyanosis: Long-Term Cognitive Sequelae and Behavioral Consequences. Appl Neuropsychol Child. enero de 2012;1(1):48-52.
8. Pugliese V, Bruni A, Carbone EA, Calabrò G, Cerminara G, Sampogna G, et al. Maternal stress, prenatal medical illnesses and obstetric complications: Risk factors for schizophrenia spectrum disorder, bipolar disorder and major depressive disorder. Psychiatry Res. enero de 2019;271:23-30.
9. Barkhuizen M, van den Hove DLA, Vles JSH, Steinbusch HWM, Kramer BW, Gavilanes AWD. 25 years of research on global asphyxia in the immature rat brain. Neurosci Biobehav Rev. abril de 2017;75:166-82.
10. Saraceno GE, Caceres LG, Guelman LR, Castilla R, Udovin LD, Ellisman MH, et al. Consequences of excessive plasticity in the hippocampus induced by perinatal asphyxia. Exp Neurol. diciembre de 2016;286:116-23.
11. Herrera MI, Kölliker-Frers R, Barreto G, Blanco E, Capani F. Glial Modulation by N-acylethanolamides in Brain Injury and Neurodegeneration. Front Aging Neurosci. 26 de abril de 2016;8:81.
12. Acosta A, Nieto K, Gonzalez A, Ovalle LF, Mora JA, Tramontini C. Anatomía del cerebelo en imágenes de TAC y resonancia magnética cerebral con correlación funcional. Rev Médica Sanitas. 30 de septiembre de 2018;21(3):135-40.

13. Volpe JJ. Cerebellum of the Premature Infant: Rapidly Developing, Vulnerable, Clinically Important. *J Child Neurol.* septiembre de 2009;24(9):1085-104.
14. Blanco D, García-Alix A, Valverde E, Tenorio V, Vento M, Cabañas F. Neuroprotección con hipotermia en el recién nacido con encefalopatía hipóxico-isquémica. Guía de estándares para su aplicación clínica. *An Pediatría.* noviembre de 2011;75(5):341.e1-341.e20.
15. Pang R, Avdic-Belltheus A, Meehan C, Martinello K, Mutshiya T, Yang Q, et al. Melatonin and/or erythropoietin combined with hypothermia in a piglet model of perinatal asphyxia. *Brain Commun.* 1 de diciembre de 2020;3(1):fcaa211.
16. Robertson NJ, Meehan C, Martinello KA, Avdic-Belltheus A, Boggini T, Mutshiya T, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells as an adjunct therapy with therapeutic hypothermia in a piglet model of perinatal asphyxia. *Cytotherapy.* junio de 2021;23(6):521-35.
17. Udovin LD, Kobiec T, Herrera MI, Toro-Urrego N, Kusnier CF, Kölliker-Frers RA, et al. Partial Reversal of Striatal Damage by Palmitoylethanolamide Administration Following Perinatal Asphyxia. *Front Neurosci.* 8 de enero de 2020;13:1345.
18. Herrera MI, Otero-Losada M, Udovin LD, Kusnier C, Kölliker-Frers R, de Souza W, et al. Could Perinatal Asphyxia Induce a Synaptopathy? New Highlights from an Experimental Model. *Neural Plast.* 2017;2017:3436943.
19. Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin Fetal Neonatal Med.* octubre de 2010;15(5):293-8.
20. Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci.* abril de 2019;20(4):235-45.
21. Sztainberg Y, Chen A. An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc.* septiembre de 2010;5(9):1535-9.
22. Diaz R, Miguel PM, Deniz BF, Confortim HD, Barbosa S, Mendonça MCP, et al. Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci.* octubre de 2016;53(1):35-45.
23. Bjelke B, Andersson K, Ögren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res.* marzo de 1991;543(1):1-9.
24. Capani F, Loidl F, Lopez-Costa JJ, Selvin-Testa A, Saavedra JP. Ultrastructural changes in nitric oxide synthase immunoreactivity in the brain of rats subjected to perinatal asphyxia: neuroprotective effects of cold treatment. *Brain Res.* noviembre de 1997;775(1-2):11-23.
25. Saraceno GE, Bertolino MLA, Galeano P, Romero JI, Garcia-Segura LM, Capani F. Estradiol therapy in adult hood

reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Exp Neurol.* junio de 2010;223(2):615-22.

26. Kiss P, Vadasz G, Kiss-Illes B, Horvath G, Tamas A, Reglodi D, et al. Environmental Enrichment Decreases Asphyxia-Induced Neurobehavioral Developmental Delay in Neonatal Rats. *Int J Mol Sci.* 13 de noviembre de 2013;14(11):22258-73.
27. Cebal E, Capani F, Selvín-Testa A, Funes MR, Coirini H, Loidl CF. NEOSTRIATAL CYTOSKELETON CHANGES FOLLOWING PERINATAL ASPHYXIA: EFFECT OF HYPOTHERMIA TREATMENT. *Int J Neurosci.* enero de 2006;116(6):697-714.
28. Campanille V, Saraceno GE, Rivière S, Logica T, Kölliker R, Capani F, et al. Long lasting cerebellar alterations after perinatal asphyxia in rats. *Brain Res Bull.* 1 de julio de 2015;116:57-66.
29. Herrera MI, Udovin LD, Kobiec T, Toro-Urrego N, Kusnier CF, Kölliker-Frers RA, et al. Palmitoylethanolamide attenuates neurodevelopmental delay and early hippocampal damage following perinatal asphyxia in rats. *Front Behav Neurosci.* 25 de agosto de 2022;16:953157.