



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Biológicas Modalidad Directa

TESIS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN AGONISTA DE LA GnRH
EN UN MODELO DE PARÁLISIS CEREBRAL EN RATAS
NEONATAS**

PRESENTA

Karina Alejandra Pedroza García

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

TUTORES

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Dra. Denisse Calderón Vallejo

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Aguascalientes, Ags., 22 de septiembre de 2023

AUTORIZACIONES

MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutoral** designado de la estudiante **KARINA ALEJANDRA PEDROZA GARCÍA** con ID 100139 quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN AGONISTA DE LA GnRH EN UN MODELO DE PARÁLISIS CEREBRAL EN RATAS NEONATAS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 18 de octubre de 2023.



Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis



Dra. Denisse Calderon Vallejo
Co-Tutor de tesis



Dr. Andrés Quintanar Stephano
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
 c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
 Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
 Actualización: 00
 Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 26-oct-23

NOMBRE: KARINA ALEJANDRA PEDROZA GARCÍA ID 100139
PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA LGAC (del posgrado): PROTEÍNAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y LA SECRECIÓN NEUR/
TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico
TITULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN AGONISTA DE LA GnRH EN UN MODELO DE PARÁLISIS CEREBRAL EN RATAS NEONATAS
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

DETERMINAR EL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPLORIDA SOBRE LA PARÁLISIS CEREBRAL

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JÁMBOS RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALEFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado


En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Nota: NO ES CANDIDATO A SUMMA CUM LAUDE

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy: Perspectives of Neuroprotective and Neuroregenerative Treatments

Karina A. Pedroza-García¹  Denisse Calderón-Vallejo^{1,2} J. Luis Quintanar¹

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Laboratorio de Neurofisiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

² Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

Address for correspondence: Dr. J. Luis Quintanar, Departamento de Fisiología y Farmacología, Laboratorio de Neurofisiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, México (e-mail: jose.quintanar@edu.uaa.mx).

Neuropediatrics 2022;53:402–417.

Abstract

Hypoxic–ischemic encephalopathy (HIE) is a serious condition that could have deleterious neurological outcomes, such as cerebral palsy, neuromotor disability, developmental disability, epilepsy, and sensitive or cognitive problems, and increase the risk of death in severe cases. Once HIE occurs, molecular cascades are triggered favoring the oxidative stress, excitotoxicity, and inflammation damage that promote cell death via apoptosis or necrosis. Currently, the therapeutic hypothermia is the standard of care in HIE; however, it has a small window of action and only can be used in children of more than 36 gestational weeks; for this reason, it is very important to develop new therapies to prevent the progression of the hypoxic–ischemic injury or to develop neuroregenerative therapies in severe HIE cases. The objective of this revision is to describe the emerging treatments for HIE, either preventing cell death for oxidative stress, excitotoxicity, or exacerbated inflammation, as well as describing a new therapeutic approach for neuroregeneration, such as mesenchymal stem cells, brain-derived neurotrophic factor, and gonadotropin releasing hormone agonists.

Keywords

- ▶ excitotoxicity
- ▶ hypoxic–ischemic encephalopathy
- ▶ inflammation
- ▶ neuroprotection
- ▶ neuroregeneration
- ▶ oxidative stress

Introduction

Hypoxic–ischemic encephalopathy (HIE) appears as a result of decreased oxygen and blood flow supply to the brain, the HIE incidence is estimated between 1.5 and 3 per 1,000 live births¹; in moderate HIE, patients have a 10% risk of death and 60% of children with severe HIE die; while 30% of moderate HIE and almost all surviving children with severe HIE could have neurological outcomes such as cerebral palsy, neuromotor disability, developmental disability, epilepsy, and sensitive or cognitive problems.²

The standard of care for HIE is the therapeutic hypothermia (TH) which has demonstrated significant reductions in

neurological outcomes when compared with controls.³ However, hypothermia only can be used in term children or at least in children with 36 weeks' gestational age, it should be administered in the first 6 hours after the insult and requires special equipment that in low- or middle-income countries could be difficult to achieve due to the lack of infrastructure.⁴

There is a serious need for developing new treatments to prevent or correct the brain damage after a neonatal hypoxic–ischemic event. The objective of this revision is to describe the emerging treatments for HIE, either preventing cell death for oxidative stress, excitotoxicity, or exacerbated inflammation, as well as describing new therapeutic approaches for neuroregeneration.

received
January 24, 2022
accepted after revision
June 21, 2022
published online
August 28, 2022

© 2022, Thieme. All rights reserved.
Georg Thieme Verlag KG,
Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1755235>.
ISSN 0174-304X.

Brief Report

Neuroimmunomodulation

Neuroimmunomodulation 2023;30:206–212
 DOI: 10.1159/000533388

Received: May 12, 2023
 Accepted: July 31, 2023
 Published online: August 22, 2023

Effect of Leuprolide Acetate, a GnRH Agonist, on Neuroinflammation and Anxiety-Like Behavior after Mild Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Rat Model

Karina Alejandra Pedroza-García^a Denisse Calderón-Vallejo^{a, b}
 Daniel Cervantes-García^{c, d} Andrés Quintanar-Stephano^e Eva Salinas^c
 J. Luis Quintanar^a

^aLaboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; ^bDepartamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; ^cLaboratorio de Inmunología, Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; ^dConsejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico; ^eLaboratorio de Neuroendocrinología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

Keywords

Anxiety-like behavior · Immunomodulation · Mild hypoxic-ischemic encephalopathy · Neuroinflammation · Neuroprotector

Abstract

Background: Mild hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is a condition that predisposes to negative outcomes such as neuroanatomical injury, mood disorders, and motor or cognitive disabilities. The neuroinflammation plays an important role in the neurological damage; therefore, reducing it could provide neuroprotection. The leuprolide acetate (LA) has shown to have neuroregenerative and immunomodulator properties in other nervous system injuries. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of LA in the acute phase of mild HIE and its effects in motor activity and behavior in a subacute phase. **Method:** Forty-five Wistar rats on postnatal day 7 were divided into Sham, HIE treated with saline solution (HIE-SS), and HIE-LA. The HIE was performed cutting of the right carotid artery followed by 60 min of hypoxia. The

expression of the inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , and the chemokine CXCL-1 were evaluated 72 h after HIE by RT-qPCR and the motor activity and behavior were evaluated by open field test at postnatal day 33. **Results:** HIE-SS animals showed increased expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , and CXCL-1 genes in injured tissue. However, the HIE-LA group exhibited similar expression levels of IL-1 β and TNF- α to the Sham group, while IFN- γ and CXCL-1 mRNA expression were attenuated with LA treatment. LA treatment also prevented anxiety-like behavior in the open field test. **Conclusion:** Treatment with LA partially reverses HIE-induced neuroinflammation and prevents anxiety-like behavior in neonatal rats.

© 2023 The Author(s).
 Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is a serious condition that predisposes to neurological damage, cerebral palsy, and motor and cognitive disabilities. The

karger@karger.com
 www.karger.com/nim

© 2023 The Author(s).
 Published by S. Karger AG, Basel

Correspondence to:
 J. Luis Quintanar, josequintanar@eduuaa.mx
 Denisse Calderón-Vallejo, denisse.calderon@edu.uaa.mx



This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>). Usage and distribution for commercial purposes requires written permission.

Downloaded from <http://karger.com/nim/article-pdf/30/1/206/4001198/000533388.pdf> by Universidad Autonoma de Aguascalientes user on 18 September 2023

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca 715439, que contribuyó notoriamente para lograr el término de los estudios de doctorado.

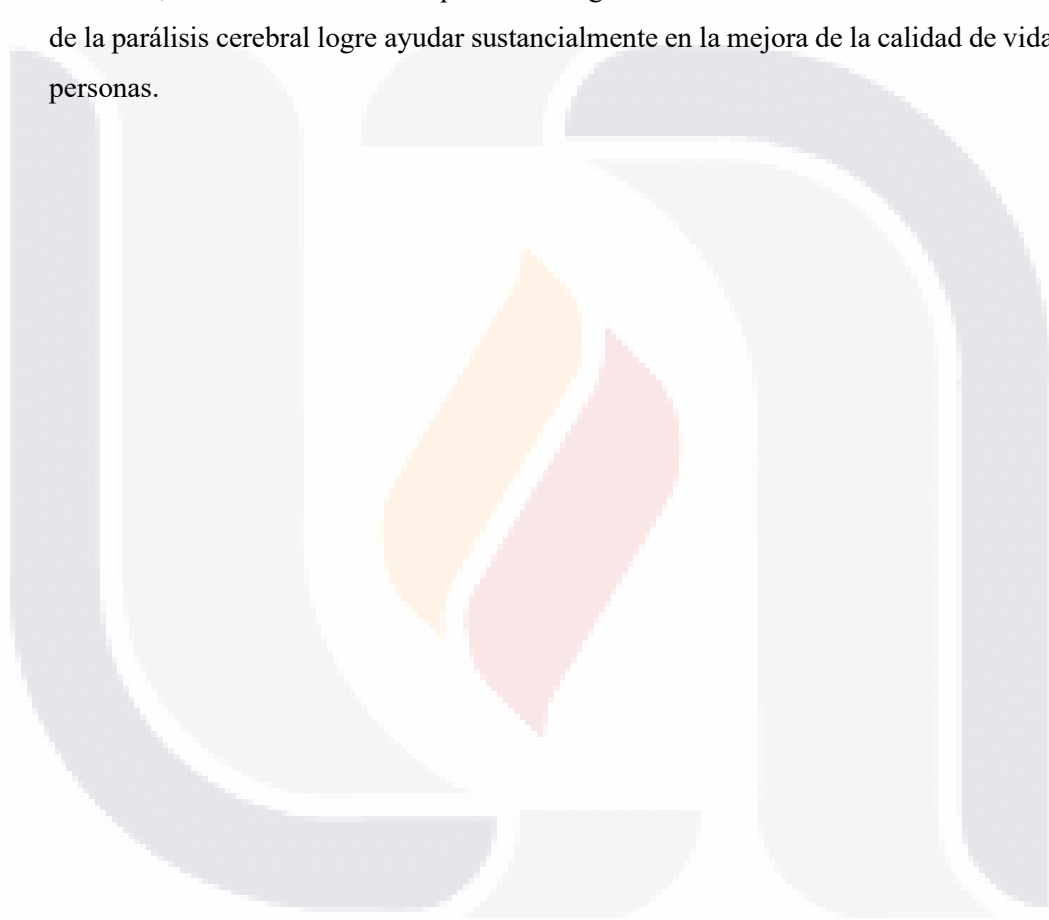
Con una mención especial, quisiera agradecer al Dr. José Luis Quintanar Stephano por codirigir y financiar este proyecto de investigación, además de orientar, revisar y corregir los artículos derivados de esta tesis en cada etapa del proceso de elaboración. También quiero agradecer a la Dra. Denisse Calderón Vallejo por la codirección de este trabajo y sobre todo por su paciencia en orientarme y capacitarme para el desarrollo del modelo de hipoxia-isquemia, así como su apoyo incondicional para la redacción y corrección de la tesis y los artículos de investigación. Así mismo, quisiera agradecer al Dr. Andrés Quintanar Stephano por sus atinadas recomendaciones y compartir su amplio conocimiento en la microcirugía y fisiología, siempre es asombroso verlo operar y aprender de su experiencia. También me gustaría mencionar que agradezco la excelente calidad humana de este equipo de trabajo que hace del laboratorio un lugar de lo más agradable para ir a trabajar y disfrutar de la investigación y el aprendizaje.

Quisiera agradecer de manera especial el apoyo recibido en el procesamiento histológico de las muestras al técnico Manuel Tinajero Ruelas, a la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña y a la técnico Sonia Sofía Muñoz Cruz, sin su ayuda esta tesis no estaría completa. Además, quisiera agradecer la colaboración llevada a cabo con los investigadores miembros del Laboratorio de Inmunología, especialmente a la Dra. Eva María Salinas Miralles, al Dr. Daniel Cervantes García y la Dra. Laura Dávalos cuyas importantes aportaciones en la evaluación de la respuesta inmunológica del modelo de hipoxia-isquemia fue de gran ayuda para la elaboración del segundo artículo de investigación, gracias infinitas por su paciencia y enseñanza.

Finalmente, quisiera agradecer a mi mejor amigo y esposo Ricardo Ramírez por haberme motivado a estudiar mi doctorado y apoyarme incondicionalmente para lograr mis objetivos.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a todas aquellas personas que viven con parálisis cerebral y a sus familiares, que tenaz y pacientemente les apoyan a pesar de los retos y obstáculos a los que se enfrentan, deseo fervientemente que la investigación en temas relacionados con el tratamiento de la parálisis cerebral logre ayudar sustancialmente en la mejora de la calidad de vida de estas personas.



Índice General

Introducción 10

Planteamiento del Problema 12

Marco Teórico..... 13

 Parálisis cerebral 13

 Factores de riesgo de parálisis cerebral 13

 Clasificación de la parálisis cerebral..... 14

 Alteraciones moleculares inducidas por hipoxia-isquemia cerebral perinatal..... 18

 Principales estructuras cerebrales afectadas por la hipoxia-isquemia perinatal..... 21

 Tratamientos actuales para la hipoxia-isquemia cerebral perinatal 25

 Papel de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el tratamiento de enfermedades neurológicas..... 29

Justificación 36

Hipótesis 37

Objetivos de la investigación..... 37

 Objetivo General..... 37

 Objetivos específicos 37

Material y Métodos..... 37

 Sujetos..... 37

 Procedimiento para generar la lesión por hipoxia-isquemia..... 38

 Tratamiento..... 40

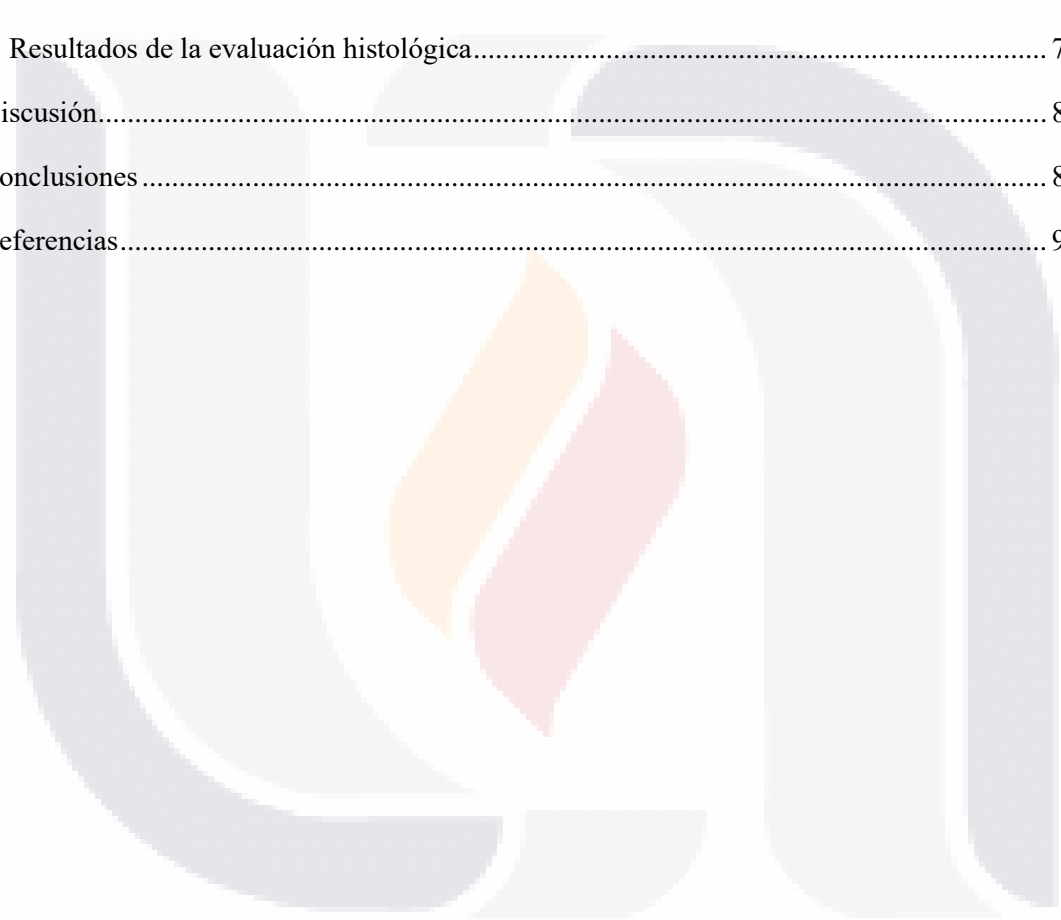
 Evaluación de la Función Motora 40

 Evaluación de la Función Cognitiva 44

 Evaluación histológica y molecular 48

 Evaluación histológica de la lesión por hipoxia-isquemia cerebral perinatal 52

Análisis estadístico.....	53
Resultados	54
Estandarización de la cirugía por hipoxia isquemia cerebral perinatal	54
Resultados de la evaluación de la función motora	56
Resultados de la evaluación de la función cognitiva.....	66
Resultados de la evaluación molecular	70
Resultados de la evaluación histológica.....	78
Discusión.....	80
Conclusiones	89
Referencias.....	90



Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la parálisis cerebral por la afección fisiológica 17

Tabla 2. Evaluación neonatal APGAR 26

Tabla 3. Criterios para definir la encefalopatía moderada y severa 27

Tabla 4. Criterios de exclusión, efectos secundarios e indicaciones de suspensión de la hipotermia terapéutica..... 28

Tabla 5. Ejemplos de agonistas de la GnRH 34

Tabla 6. Anticuerpos primarios para evaluar la respuesta inflamatoria 50

Tabla 7. Anticuerpos secundarios para evaluar respuesta inflamatoria..... 51

Tabla 8. Anticuerpos primarios para evaluar daño estructural 51

Tabla 9. Estandarización del tamaño de camada..... 55

Tabla 10. Comparación del ángulo de extremidades posteriores entre los grupos sham, SS y AL a las 24, 48 y 72 horas postcirugía..... 57

Tabla 11. Comparación del tiempo de enderezamiento (s) en ratas sham y con lesión hipóxica isquémica del grupo SS y AL a las 24, 48 y 72 horas posterior a la cirugía 58

Tabla 12. Comparación de la evaluación de la prueba de campo abierto en ratas sham y con HICP del grupo SS y AL en la tercera semana de tratamiento..... 60

Tabla 13. Datos descriptivos de las variables discriminación relativa y % total de investigación del objeto novedoso de los grupos sham, SS y AL..... 66

Tabla 14. Datos descriptivos de las variables discriminación relativa y % total de investigación del objeto en la ubicación novedosa para los grupos sham, SS y AL..... 68

Tabla 15. Comparación de la evaluación de la prueba laberinto en Y para los grupos sham, SS y AL..... 70

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de la parálisis cerebral por el trastorno del movimiento, por la alteración anatómica y por la alteración fisiológica..... 15

Figura 2. Esquema simplificado de las principales cascadas de lesión molecular involucradas en la encefalopatía por hipoxia isquemia. 20

Figura 3. Microfotografía de un corte coronal al nivel del hipocampo con doble tinción de Timm-Nissl. 22

Figura 4. Circuito trisináptico del hipocampo..... 23

Figura 5. Formación de neuronas en el giro dentado (GD) del hipocampo.. 24

Figura 6. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal..... 30

Figura 7. Representación del receptor GnRH humano 31

Figura 8. Mecanismo propuesto de control autocrino en la secreción pulsátil de GnRH. 33

Figura 9. Línea del tiempo experimental 38

Figura 10. Técnica utilizada para lesión isquémica en ratas de 7 días posnatales 39

Figura 11. Inducción de la lesión hipóxica..... 40

Figura 12. Evaluación de la posición de las patas posteriores 42

Figura 13. Evaluación del reflejo de enderezamiento 42

Figura 14. Campo abierto adaptado con actímetro por detección infrarroja del movimiento y ejemplificación de la división de la arena para el análisis de datos. 43

Figura 15. Rota rod utilizado para evaluar la coordinación motora..... 44

Figura 16. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso 45

Figura 17. Prueba de reconocimiento de lugar..... 46

Figura 18. Laberinto en Y utilizando el software SMART para registrar el desplazamiento del animal..... 48

Figura 19. Áreas de interés para el análisis morfométrico del hipocampo 52

Figura 20. Lesión por hipoxia isquemia en cerebros de rata de 8 días posnatales en los que se compararon dos tiempos y flujos de gas para el modelo de hipoxia..... 55

Figura 21. Fotomicrografías representativas del giro dentado (GD) del hipocampo del hemisferio derecho para los grupos sham (A), SS (B) y AL (C) 78



Índice de Gráficas

Gráfica 1. Comparación de anestésicos para la cirugía por hipoxia-isquemia cerebral perinatal 54

Gráfica 2. Comparación de los tiempos y flujos de gas para el modelo de hipoxia..... 56

Gráfica 3. Comparación del ángulo de extremidades posteriores entre los grupos sham, SS y AL a las 24, 48 y 72 horas postcirugía 57

Gráfica 4. Predilección de giro para el reflejo de enderezamiento en los días postnatales 8, 9 y 10 (a las 24, 48 y 72 h postcirugía) de los grupos sham, SS y AL..... 59

Gráfica 5. Comparación de la diferencia en la actividad total, tiempo en la zona periférica y actividad en la zona periférica en la 4ª semana de tratamiento. 62

Gráfica 6. Comparación de la distancia, la velocidad y la frecuencia de *rearings* o conducta de erguirse en dos patas en la zona periférica y la frecuencia de entradas que tuvieron los animales a la zona central en la 4ª semana de tratamiento. 63

Gráfica 7. Comparación de la distancia recorrida por minuto en la zona periférica del campo abierto durante la 4ª semana de tratamiento..... 64

Gráfica 8. Comparación del tiempo de permanencia durante la prueba de Rota rod..... 65

Gráfica 9. Comparación del tiempo y velocidad en la prueba de rota rod el día de evaluación (día 4)..... 65

Gráfica 10. Discriminación relativa y porcentaje total de investigación del objeto novedoso en ratas sham y ratas con lesión hipóxico-isquémica de los grupos SS y AL..... 67

Gráfica 11. Discriminación relativa y porcentaje total de investigación del objeto en la nueva ubicación en ratas sham y ratas con lesión hipóxico-isquémica de los grupos SS y AL 68

Gráfica 12. Comparación del número de tripletes, el % de alternancia, número de *rearings* y velocidad promedio durante la evaluación de la prueba del laberinto en Y para los grupos sham, SS y AL 69

Gráfica 13. Expresión de mRNA por qPCR de IL-1 β y TNF- α en ratas sham y con lesión HI tratadas con SS y AL, 72 horas posterior a la lesión..... 71

Gráfica 14. Veces de cambio con respecto a sham de la relación p-I κ B α /I κ B α A) corteza y B) hipocampo de ratas de los grupos sham, SS y AL a las 72 h de la lesión HI..... 72

Gráfica 15. Inmunotransferencias representativas de I κ B α y p-I κ B α en cortezas e hipocampos de ratas de los grupos sham, SS y AL a las 72 h de la lesión HI. 74

Gráfica 16. Inmunotransferencias representativas de la expresión de NF-200 en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento 75

Gráfica 17. Inmunotransferencias representativas de la expresión de espinofilina en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento. 76

Gráfica 18. Inmunotransferencias representativas de la expresión de MAP-2 en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento 77

Gráfica 19. Inmunotransferencias representativas de la expresión de MBP en corteza (n=5) e hipocampo (n=4) de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento. 77

Gráfica 20. Comparación del conteo de neuronas en las 5 zonas en las que se dividió el giro dentado del hipocampo para los grupos sham, SS y AL..... 79

Resumen

La hipoxia-isquemia cerebral perinatal (HICP) tiene una incidencia de 1 a 3 casos por cada 1000 niños nacidos vivos y es una de las principales causas de parálisis cerebral (PC) por ello se requieren terapias innovadoras. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del AL en un modelo de PC con ratas neonatas sometidas a HICP. Para ello se utilizaron 78 ratas Wistar de ambos sexos de 7 días las cuales se dividieron en 3 grupos: sham, HICP + solución salina (SS) e HICP + AL (AL). A los grupos de SS y AL se les realizó la lesión HICP siguiendo la técnica de Rice & Vanucci y posteriormente se inició el tratamiento (10µg/kg IM) 3 días consecutivos y después cada cuarto día durante 5 semanas. Se evaluó la función motora (pruebas de reflejos neonatales, campo abierto y rota rod), la función cognitiva (prueba de reconocimiento de objeto novedoso, reconocimiento de lugar y laberinto en Y), la inflamación (expresión de IL-1β y TNF-α mediante RT-qPCR y la relación p-IκBα/IκBα mediante western blot), el efecto neurotrófico (expresión de las proteínas NF-200, espinofilina, MAP-2 y MBP por western blot) y el daño histológico mediante el conteo de neuronas en el giro dentado del hipocampo. En comparación con el grupo sham, las ratas tratadas con SS tuvieron un incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β y TNF-α y la conducta ansiosa, mientras que el grupo de AL tuvo una expresión similar a sham excepto en la prueba de memoria espacial. En conclusión, el AL tiene un papel inmunomodulador si es administrado en las primeras horas después de la lesión y previene la conducta ansiolítica en un modelo de HICP en ratas, aún hace falta realizar más estudios para esclarecer la seguridad de su uso en la etapa neonatal.

Palabras clave: Acetato de leuprolida, hipoxia-isquemia cerebral perinatal, hormona liberadora de gonadotropinas, inmunomodulación, parálisis cerebral.

Abstract

Perinatal hypoxia-ischemia brain injury (PHIBI) has an incidence of 1 to 3 cases per 1,000 live births and is one of the main causes of cerebral palsy (CP), which is why innovative therapies are required. The objective of this study was to evaluate the effect of leuprolide acetate (LA) in a CP model with neonatal rats subjected to PHIBI. For this, 78 7-day-old Wistar rats of both sexes were used, which were divided into 3 groups: sham, PHIBI + saline solution (SS) and PHIBI + AL (AL). The SS and AL groups underwent the PHIBI lesion following the Rice & Vanucci technique and subsequently started treatment (10µg/kg IM) on 3 consecutive days and then every fourth day for 5 weeks. We evaluated motor function (neonatal reflex tests, open field, and rota rod), cognitive function (novel object recognition test, place recognition, and Y-maze), inflammation (IL-1β and TNF-α expression by RT-qPCR and the p-IκBα/IκBα ratio by w), the neurotrophic effect (expression of NF-200, spinophylline, MAP-2 and MBP proteins by WB) and histological damage by counting neurons in the dentate gyrus of the hippocampus. Compared with the sham group, SS-treated rats had increased expression of the proinflammatory cytokines IL-1β, TNF-α and anxious behavior, while the AL group had expression like sham except for the test of spatial memory. In conclusion, LA has an immunomodulatory role if it is administered in the first hours after the injury and prevents anxiolytic behavior in a rat model of PHIBI. More studies are still needed to clarify the safety of its use in the neonatal stage.

Key words: Cerebral palsy, gonadotropin-releasing hormone, immunomodulation, leuprolide acetate, perinatal hypoxia-ischemia brain injury.

Introducción

La hipoxia-isquemia cerebral perinatal (HICP) es el factor etiológico del 30% de las encefalopatías cerebrales, entre las que destaca la parálisis cerebral (PC) (Triulzi et al., 2006; Zhang et al., 2013). La incidencia mundial de la PC es de 2 a 2.5 casos por cada 1000 niños nacidos vivos (Oskoui et al., 2013) y en México se diagnostican 12 mil casos nuevos de PC cada año (Centro de Cirugía Especial de México IAP, 2017).

Las personas afectadas tienen una discapacidad de por vida que puede afectar su función motora y cognitiva e incluso pueden tener otras comorbilidades, destacando la epilepsia, problemas sensitivos como la disminución o pérdida de la vista o la audición, problemas de comunicación y problemas músculo esqueléticos secundarios (Stavsky et al., 2017), en algunos casos la afección es tan importante que el individuo depende totalmente del cuidado de otros limitando su independencia.

Si bien el daño cerebral en la PC no es progresivo, el estado funcional o las habilidades de la persona pueden agravarse en etapas posteriores de la vida, lo que trae consigo incrementos en el gasto de atención en salud, en México el costo para la atención de un paciente con PC en la etapa infantil oscila entre los 5,000 y 36,000 (Martínez Caire, 2015), mientras que en otros países se han reportado cifras superiores al millón de dólares por cada paciente con PC a lo largo de su vida (Tonmukayakul et al., 2018). Entre los tratamientos más frecuentes en pacientes con PC están la terapia física, cirugías ortopédicas, el tratamiento con inyección de toxina botulínica, la rizotomía dorsal selectiva y la terapia de lenguaje; por otro lado, también son comunes los gastos en aditamentos ortopédicos, prótesis auditivas o tratamientos oftalmológicos especiales (Kim et al., 2018), cabe señalar que todos ellos sólo son tratamientos paliativos pues no existe una cura para la PC.

Con el fin de evitar la aparición de la parálisis cerebral, se han probado nuevas terapias para disminuir el daño causado por la HICP. Actualmente el único tratamiento que ha demostrado tener un efecto protector es la hipotermia terapéutica (HT) (Lemyre & Chau, 2018); sin embargo, en los casos más graves aún existe un 60% de riesgo de muerte y aproximadamente el 30% de los casos moderados desarrollan alteraciones neurológicas que favorecen la aparición de PC, discapacidad del desarrollo, discapacidad neuromotora, problemas cognitivos

y/o sensitivos. Por lo antes mencionado, se están probando terapias innovadoras en modelos animales, como el uso de antiinflamatorios, anticonvulsivos (Celik et al., 2016; Komur et al., 2014), nanopartículas, antioxidantes, anestésicos y hormonas como la melatonina (Robertson et al., 2012) y los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Chu et al., 2010).

Se ha demostrado que la GnRH tiene efectos similares a los factores neurotróficos, lo que podría sugerir su uso en el tratamiento de la HICP. En cultivos de neuronas corticales y de médula espinal de embriones de rata, la GnRH favoreció el incremento de excrecencias y la longitud de las neuritas (Quintanar et al., 2016; Quintanar & Salinas, 2008); mientras que en modelos animales de lesión medular tuvo efecto en la mejora de la actividad locomotora, la micción y disminuyó el daño histopatológico de la lesión (Calderón-Vallejo et al., 2015; Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012); resultados similares se han reportado con el uso de agonistas de la GnRH, gracias a su mayor afinidad a los receptores de la GnRH, su resistencia a la proteólisis y por ende su mayor actividad biológica, se requieren dosis menores y más espaciadas (Díaz-Galindo et al., 2015).

Chu et al., (2008), propuso que la GnRH y su receptor podrían participar en la neuroregeneración y la regulación de la lesión por isquemia-reperfusión en el hipocampo, pues observó que después de un evento hipóxico-isquémico, disminuyó la expresión de la hormona, su receptor y el ARNm en la región CA1 del hipocampo, lo que se asoció con mayor apoptosis. Posteriormente, se probó el efecto profiláctico de la administración de un agonista de la GnRH en un modelo animal de oclusión de la arteria cerebral media, encontrándose una disminución significativa en la apoptosis de las células del hipocampo después de la perfusión, esto evidenciado por un menor número de neuronas piramidales positivas a TUNEL en la región CA1 del hipocampo (Chu et al., 2010).

El acetato de leuprolida (AL), un agonista de la GnRH, también se ha visto implicado en la ganancia de peso y al parecer tiene un efecto modulador en la actividad inmune, disminuyendo la expresión de la microglía activada y la reducción en la activación del factor nuclear κB (NF- κB), interleucinas 1β (IL- 1β) e IL-17A, en modelos de encefalomiелitis autoinmune experimental (Guzmán-Soto et al., 2012, 2016). Finalmente, en un ensayo clínico fase II se

demostró que el AL logró la recuperación motora y sensitiva en pacientes con lesión crónica de la médula espinal, aumentando su nivel de independencia (Quintanar et al., 2018).

Planteamiento del Problema

La HICP es una de las principales causas de la parálisis cerebral, una condición que perdura a lo largo de la vida y que limita las funciones motoras y cognitivas de quien la padece. En la práctica clínica sólo se dispone de la hipotermia terapéutica para disminuir el daño causado por la HICP; sin embargo, en los casos más graves no ha demostrado disminuir la mortalidad o las secuelas neurológicas, por ello actualmente se buscan tratamientos alternativos que limiten el daño y tengan pocos o ningún efecto secundario.

Un posible tratamiento para limitar el daño por la HICP son los agonistas de la GnRH, esto se debe a que se han encontrado receptores de la GnRH en zonas extrahipotalámicas del sistema nervioso central (SNC) como la corteza cerebral y el hipocampo, áreas que se ven afectadas posterior a un evento hipóxico-isquémico. En estudios realizados en cultivos celulares y modelos animales de lesión medular y esclerosis múltiple, se demostró que esta hormona y sus agonistas tienen efectos neurotróficos e inmunomoduladores. Además, el acetato de leuprolida (AL), un agonista de la GnRH ya ha sido probado en ensayos clínicos de lesión crónica de la médula espinal y en pacientes con esclerosis múltiple teniendo resultados favorables en la mejora en las funciones motoras y sensitivas.

Los resultados antes mencionados refuerzan la necesidad de investigar el posible efecto neuroregenerador del AL en la recuperación motora y cognitiva posterior a una lesión por hipoxia-isquemia cerebral perinatal. De encontrarse los resultados esperados, sería una alternativa de tratamiento viable y que puede prevenir alteraciones mayores como la parálisis cerebral en el futuro de la persona.

Marco Teórico

Parálisis cerebral

La parálisis cerebral (PC) comprende un “*grupo heterogéneo de trastornos del neurodesarrollo que incluyen disfunción cerebral no progresiva que afecta el tono muscular, postura y movimientos. Los trastornos motores de la PC suelen ir acompañados de alteraciones en la sensación, percepción, cognición, comunicación, comportamiento, epilepsia y problemas músculo esqueléticos secundarios*” (Rosenbaum et al., 2007).

La epidemiología de la PC es variable en diversos países alrededor del mundo con prevalencias que van de 1.5 a 5 casos por cada 1000 niños nacidos vivos (Hollung et al., 2018; Khandaker et al., 2018; van Bakel et al., 2014). De acuerdo con el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), en Estados Unidos la prevalencia es de 1 por cada 323 niños nacidos vivos (Center for Disease Control and Prevention, 2018), mientras que en México no se tienen cifras de la prevalencia de este trastorno, una estimación hecha por Rendón-Tavera et al, reportó una prevalencia estimada de 3 a 4 por cada 10 000 niños nacidos vivos (Calzada Vázquez Vela & Vidal Ruiz, 2014; Rendon Tavera et al., 2006), sin embargo, estos datos carecen de confiabilidad y rigor metodológico, ya que no existen estudios poblacionales que respalden esta aseveración (Poblano et al., 2009); no obstante, se ha reportado en México una incidencia de 12 mil nuevos casos de PC cada año (Centro de Cirugía Especial de México IAP, 2017).

Factores de riesgo de parálisis cerebral

Existen diferentes factores de riesgo para el desarrollo de parálisis cerebral los cuales se pueden presentar en la etapa prenatal, perinatal o postnatal. Entre los factores prenatales se encuentran: infecciones intrauterinas, oclusión umbilical, hemorragias periventriculares o intraventriculares, edad materna avanzada y piroxia materna (Badawi et al., 1998; Schneider et al., 2018). Los factores perinatales comprenden: parto prematuro (< 38 semanas de gestación), parto post término (> 42 semanas de gestación), muy bajo peso al nacer (< 1500 g), leucomalacia cerebral, desprendimiento de placenta, hipoxia-isquemia perinatal, parto prolongado, prolapso e hipoglucemia neonatal (Agarwal & Verma, 2012; Demeši Drljan et al.,

2016; Salmaso et al., 2014); mientras que los postnatales comprenden enfermedad vascular cerebral, traumatismo craneoencefálico, infección cerebral como meningitis, encefalitis o meningoencefalitis, eventos hipóxicos como ahogamiento y secuelas de un estado epiléptico (Gulati & Sondhi, 2018).

Clasificación de la parálisis cerebral

Una vez que se genera el daño a nivel cerebral y se identifican signos de PC esta puede clasificarse de acuerdo con: a) el trastorno del movimiento originado, b) la localización anatómica, c) su fisiología, o bien, d) de acuerdo con lo establecido en el Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS, por sus siglas en inglés), desarrollada originalmente por Palisano et al., (1997).

a) Clasificación por trastorno de movimiento de la parálisis cerebral

En esta clasificación la parálisis cerebral se divide en tres síndromes principales: la espasticidad, la discinesia y la ataxia (Figura 1) (Rosenbaum et al., 2007).

La PC espástica es la más común, en esta se incluyen signos debido a alteraciones en las neuronas superiores de la corteza motora que incluyen espasticidad, hiperreflexia y respuesta plantar extensora. Los pacientes tienen movimientos en masa (en lugar de movimientos finos e individuales) y movimientos voluntarios lentos y con esfuerzo. Se caracterizan por tener hipertonicidad muscular (músculos tensos) (Agency for Clinical Innovation, 2018; Gulati & Sondhi, 2018).

Los pacientes con PC discinética por lo regular tienen más de una forma de movimiento involuntario. Las extremidades a menudo se tensan al intentar moverlas o con la emoción. Los reflejos tendinosos pueden ser normales o pueden ser difíciles de obtener. Los movimientos atetoides de los dedos de los pies, especialmente el dedo gordo (dedo del pie estirado) son un indicador significativo de disfunción extrapiramidal. La discinesia también se puede observar en algunos síndromes espásticos. Sin embargo, a diferencia de los pacientes con PC espástica, los niños con síndromes puramente discinéticos no desarrollan contracturas (Soria Soriano & Sánchez Arizcuren, 2014).

La PC discinética se subclasifica en coreoatetoide y distónica (Rosenbaum et al., 2007). La primera se caracteriza por contracciones rápidas, desorganizadas e impredecibles de músculos individuales o grupos musculares que involucran la cara, músculos bulbares (músculos que controlan el habla, la deglución y la masticación), extremidades proximales y dedos. Además, tienen movimientos de retorcimiento lentos que involucran músculos distales. También pueden presentarse dificultades orofaríngeas por muecas faciales y los reflejos primitivos comúnmente persisten durante toda la infancia. La PC distónica se caracteriza por la co-contracción de los músculos agonistas y antagonistas. A menudo, tienen signos piramidales coexistentes y disartria (dificultad para articular palabras y sonidos) (Gulati & Sondhi, 2018; Rosenbaum et al., 2007).

La PC atáxica es rara y debe distinguirse de los trastornos neurodegenerativos progresivos. Se debe al daño del cerebelo y se manifiesta con inestabilidad al caminar, problemas del equilibrio y de la destreza manual, con disminución en la fuerza muscular (Soria Soriano & Sánchez Arizcuren, 2014).

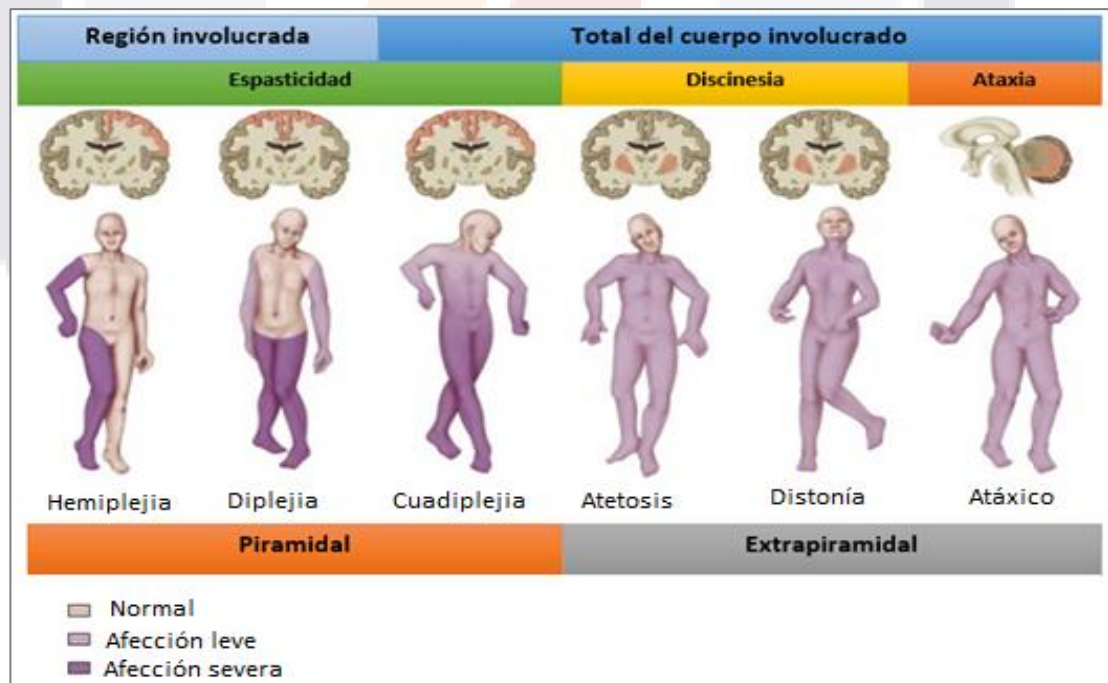


Figura 1. Clasificación de la parálisis cerebral por el trastorno del movimiento, por la alteración anatómica y por la alteración fisiológica. Adaptado de Padmakar, Kumar, & Parveen, (2018).

b) Clasificación anatómica de la parálisis cerebral

La clasificación anatómica de la PC indica cuál o cuáles son las regiones anatómicas que presentan disfunción motora, las cuales se dividen en unilaterales y bilaterales:

Unilaterales:

- Monoplejía, afecta la función motora de un solo miembro, principalmente uno de los miembros inferiores (piernas).
- Hemiplejía hace referencia al daño en un miembro inferior y superior del mismo lado del cuerpo.

Bilaterales:

- Paraplejía afecta a las dos extremidades inferiores.
- Diplejía, afecta ambos miembros superiores (brazos) o inferiores (piernas), en los miembros superiores principalmente afecta la motricidad fina y se pueden presentar alteraciones sensitivas.
- Cuadriplejía, en este caso tanto las extremidades superiores como inferiores se ven afectadas (brazos y piernas) pero existe control adecuado de la cabeza y el cuello.

Afección total del cuerpo, comprende alteración en el control de todos los miembros, incluidos el cuello y la cabeza (ver Figura 1) (Soria Soriano & Sánchez Arizcuren, 2014).

c) Clasificación fisiológica de la parálisis cerebral infantil

De acuerdo con la afección fisiológica, la PC se divide en piramidal o espástica y en extrapiramidal. En la afección piramidal se ven afectados los tractos corticoespinales, relacionados con el control motor, mientras que en la afección extrapiramidal se afectan otras regiones del cerebro asociadas a la coordinación del movimiento (núcleos basales y subcorticales). Los tipos de PC extrapiramidales incluyen la atetosis, la distonía, la ataxia, hipotonicidad, rigidez y coreiforme (Delgado & Albright, 2003), los cuales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la parálisis cerebral por la afección fisiológica

Afección fisiológica	Principales tipos	Descripción
Piramidal	Espástica	<ul style="list-style-type: none"> • Es la más frecuente, presente en el 80% de los casos. • Incremento del tono muscular dependiente de la velocidad con estiramiento pasivo. • Las contracturas articulares son comunes.
Extrapiramidal	Atetoide	<ul style="list-style-type: none"> • Discinesia (trastorno involuntario del movimiento), movimientos sin un propósito. • Contractura de articulaciones son poco frecuentes. • Disonía o hipotonía pueden estar asociadas.
	Coreiforme	<ul style="list-style-type: none"> • Movimientos involuntarios continuos sin un propósito.
Extrapiramidal	Rígida	<ul style="list-style-type: none"> • Existe hipertonicidad en ausencia de hiperreflexia, espasticidad y clonus (contracciones y relajaciones musculares repetitivas, al efectuar una extensión brusca y pasiva de un tendón). • Rigidez muscular de “rueda dentada” o “tubo de plomo”.
	Atáxica	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del movimiento coordinado, comúnmente al caminar. • Control de cabeza y cuello normal.
	Hipotónica	<ul style="list-style-type: none"> • Tono muscular bajo y reflejo tendinoso profundo normal.
Mixta		<ul style="list-style-type: none"> • Características de más de un tipo. • No hay control del cuello y la cabeza.

*Adaptado de Agarwal & Verma, 2012

d) Clasificación de la Función Motora Gruesa de la parálisis cerebral infantil

El Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS) se utiliza para clasificar la discapacidad motora funcional en niños con PC, el cual agrupa las alteraciones que se pueden presentar en 5 diferentes niveles, siendo el primer nivel el de más alta funcionalidad, mientras que el quinto nivel representa la función motora más limitada. Estos niveles o grados de discapacidad se van modificando conforme avanza la edad del niño. En niños menores de dos años las alteraciones incluidas en cada nivel se describen a continuación (Palisano et al., 1997):

- Nivel 1. El niño se sienta sin ayuda, gatea apoyado sobre las manos y las rodillas, se pone de pie sujetándose de algo y da unos pasos agarrándose de objetos cercanos. El niño camina entre los 18 meses y los 2 años sin necesidad de utilizar un dispositivo de movilidad auxiliar.
- Nivel 2. El niño puede sentarse en el piso, pero con ayuda de las manos como apoyo. Gatea con manos y rodillas. En ocasiones se pone de pie sujetándose de algo y da pasos sujetándose de objetos cercanos.
- Nivel 3. El niño se puede sentar en el piso con apoyo en la zona baja de la espalda. Se arrastra apoyado sobre el abdomen.
- Nivel 4. El niño controla el cuello, pero necesita apoyo en el tronco para sentarse en el piso; puede darse la vuelta y quedar sobre la espalda y a veces logra voltearse para quedar sobre el abdomen.
- Nivel 5. La discapacidad limita el control voluntario del movimiento. El niño necesita ayuda con el control del cuello y del tronco para sentarse.

Alteraciones moleculares inducidas por hipoxia-isquemia cerebral perinatal

El cerebro inmaduro es más susceptible a los daños producidos por la hipoxia y la isquemia ya que tiene un alto riesgo de desequilibrio oxidativo debido a su alta utilización de oxígeno, su defensa antioxidante relativamente inmadura, mayores concentraciones de hierro libre y su alta cantidad de ácidos grasos, pudiendo afectar áreas específicas del cerebro como el tálamo, la sustancia blanca periventricular y el hipocampo (Komur et al., 2014).

Este fenómeno puede explicarse a nivel celular con tres formas de daño: la primera concierne a la alteración del metabolismo energético por la disminución del flujo sanguíneo y el deficiente suministro de oxígeno, lo que genera una disminución en la concentración de trifosfato de adenosina (ATP) de la célula; la segunda, relacionada con el aumento del estrés oxidativo y la tercera comprende una respuesta inflamatoria; estos mecanismos de daño se describen en la Figura 2 (Komur et al., 2014; Millar, Shi, Hoerder-Suabedissen, & Molnár, 2017).

Posterior a la lesión por hipoxia-isquemia cerebral muchas células pueden recuperarse del estrés provocado, pero durante la fase del metabolismo oxidativo se puede generar un

importante daño neuronal; inicialmente la disminución del flujo sanguíneo y de oxígeno conllevan a un bajo aporte energético de la célula con una caída en las concentraciones de trifosfato de adenosina (ATP), falla en la bomba Na^+/K^+ , despolarización neuronal, acidosis láctica, liberación del aminoácido excitatorio glutamato y la hiperactivación de los receptores postsinápticos N-metil-D-aspartato (NMDA); cabe mencionar que el receptor NMDA está sobre expresado en el cerebro neonatal, permitiendo la entrada de calcio y sodio a la célula con la consecuente salida de potasio, esto favorece la entrada de agua provocando edema citotóxico y en casos severos causando necrosis o apoptosis celular (Choi, 1988; Drury, Gunn, Bennet, & Gunn, 2014; Millar et al., 2017).

La inflamación es otro componente principal en el daño cerebral durante la hipoxia-isquemia. La microglía, células de defensa del sistema nervioso, se activa y migra a la zona de daño, produciendo citocinas proinflamatorias, glutamato, óxido nítrico y radicales libres. De igual forma, los astrocitos participan en la respuesta inflamatoria, favoreciendo la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permitiendo el paso de leucocitos como neutrófilos, macrófagos y linfocitos T (Kaur et al., 2013; Weinstein et al., 2010).

Este daño es relevante ya que 3 de cada 10 niños que sufren HICP desarrollan una discapacidad severa o parálisis cerebral, siendo el periodo de la reperfusión que continúa a la hipoxia-isquemia en el que ocurren los daños más importantes (Komur et al., 2014).

Los principales mecanismos causantes de daño cerebral durante la reperfusión son tres: (1) el aumento en los niveles de los aminoácidos excitatorios, principalmente el glutamato; (2) la restauración rápida de la oxigenación tisular que se asocia con un incremento acelerado de óxido nítrico y formación de superóxido, ya que el cerebro es altamente susceptible al daño oxidativo de los radicales libres por su alto contenido de lípidos; y (3) el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, que podría permitir el paso de grandes proteínas hacia el espacio extracelular, incrementando la inflamación cerebral y degradación de proteínas reguladoras en la membrana basal vascular por efecto de las metaloproteasas (Drury et al., 2014).

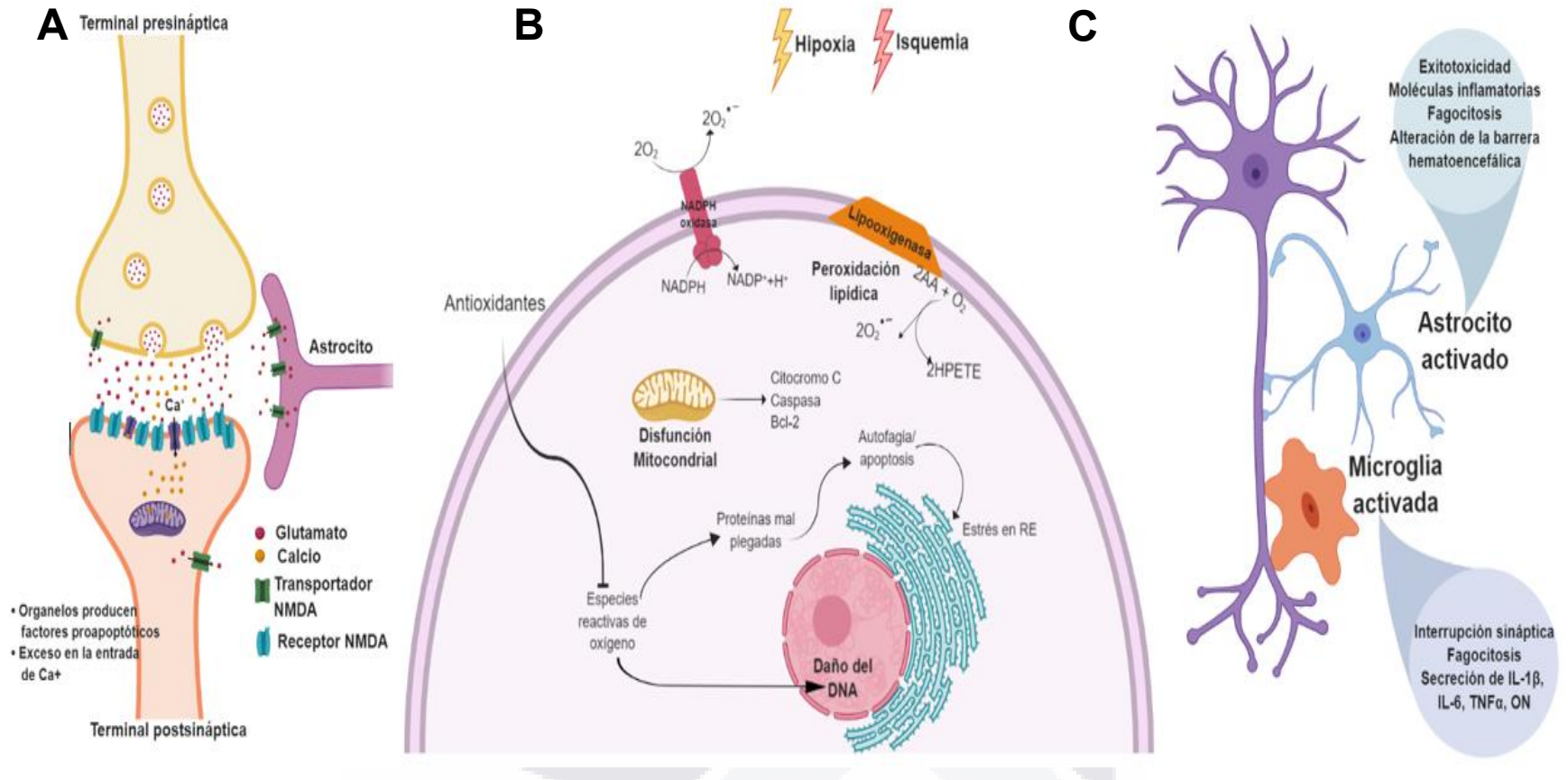


Figura 2. Esquema simplificado de las principales cascadas de lesión molecular involucradas en la encefalopatía por hipoxia-isquemia. Un gran número de moléculas contribuyen a la lesión neonatal por HICP. Estas dianas moleculares se pueden dividir en las siguientes tres cascadas. (A) Excitotoxicidad Ca²⁺: ion calcio, Mg²⁺: ion magnesio AMPA-R: receptor α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol de ácido propiónico, NMDA-R= Receptor N-metil-D-aspartato. (B) Estrés oxidativo. NADPH⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, O₂: oxígeno, O₂^{•-}: radical libre de oxígeno, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, Bcl-2: proteína leucémica de células B, RE: retículo endoplásmico, DNA= ácido desoxirribonucleico. (C) Inflamación. IL-6 = interleucina 6, IL-1β: interleucina 1 beta, TNFα: factor de necrosis tumoral alfa, ON = óxido nítrico.

Principales estructuras cerebrales afectadas por la hipoxia-isquemia perinatal

De acuerdo con estudios de imagen de resonancia magnética, se ha observado que las áreas afectadas tras un evento hipóxico-isquémico leve son: la materia blanca en una distribución de área de límite arterial “watershed”, los núcleos grises profundos, materia blanca punteada, lesiones focales del parénquima, el hipocampo y lesiones atípicas (Li et al., 2022).

Respecto al hipocampo que es una estructura importante en el aprendizaje, la memoria, el procesamiento de la información espacial y control de las emociones, adquiere gran importancia su estudio posterior a una lesión hipóxico-isquémica, especialmente porque en esta estructura se puede dar la generación de neuronas nuevas en etapas posteriores de la vida, proceso denominado “*neurogénesis en el cerebro adulto*” lo cual se ha demostrado en distintos mamíferos, incluido el humano (Moreno-Jiménez et al., 2021).

Anatomía del hipocampo

El hipocampo adquiere su nombre por su semejanza a un “caballito de mar”, anatómicamente está ubicado bilateral y simétricamente en el lóbulo temporal, esta estructura cerebral está conformada por dos campos arquicorticales interrelacionados: el hipocampo propiamente (cuerno de Amón) el cual se divide en 3 zonas CA1, CA2 y CA3, y el giro dentado (GD) (Teyler & Discenna, 1984), el modelo de hipocampo de los roedores se utilizará para explicar la estructura y proyecciones de esta estructura cerebral debido a que es un buen modelo anatómico que ha sido estudiado a detalle previamente.

El hipocampo propiamente dicho se caracteriza por la presencia de neuronas piramidales. El área CA1 contiene las células piramidales más pequeñas, mientras que en las zonas CA2 y CA3 las células son de mayor tamaño. El hipocampo se encuentra dividido por capas. La capa más interna es rica en fibras y se le denomina *alveus* o sustancia blanca. Después le sigue una capa más delgada formada por las dendritas basales de las células piramidales, denominada *stratum oriens* (Or), y a la capa de los somas de dichas células se le conoce como *stratum pirmidale* (Py), estas células son de tipo glutamatérgico. Posteriormente, se encuentra el *stratum radiatum* (Rad), formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales y en la zona más externa se encuentra el *stratum lacunosum moleculare* (LMol), en el cual se encuentran las

ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las células piramidales. Sólo en el área CA3, se puede encontrar un estrato acelular entre los *stratum pyramidale* y *radiatum*, el cual está formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales procedentes de CA3 y donde se establecen conexiones con las fibras musgosas provenientes del GD, denominado *stratum lucidem* (SLu) (Amaral & Witter, 1989) estas capas del hipocampo se pueden observar en la Figura 3.

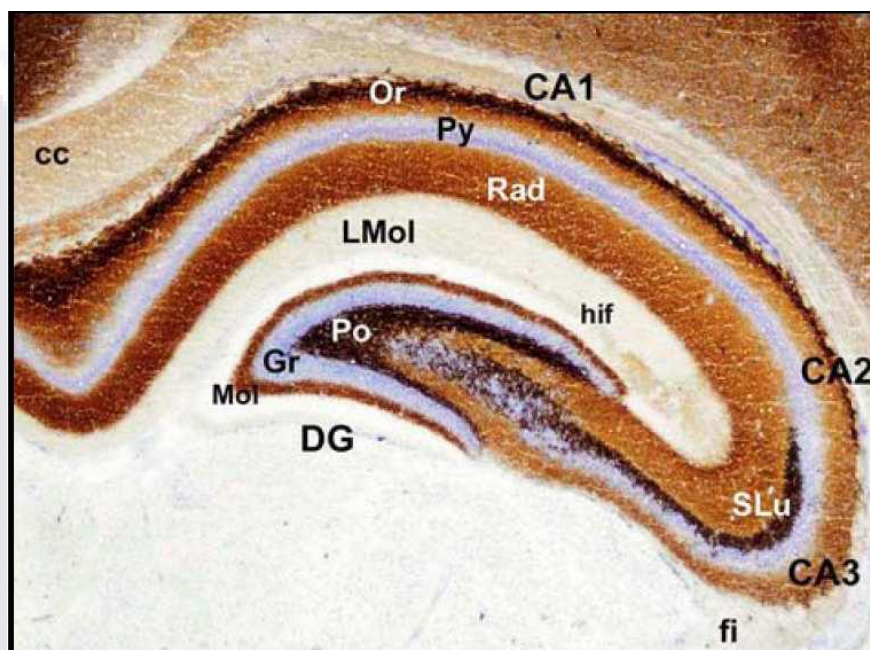


Figura 3. Microfotografía de un corte coronal al nivel del hipocampo con doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: *oriens* (Or), *piramidal* (Py), *radiatum* (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente en la zona CA3 se encuentra la capa *stratum lucidem* (SLu). En el giro dentado (DG), debajo de la fisura hipocámpica (hif), se observa la capa molecular (Mol) y en la parte interna la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa de células polimorfonucleares (Po). fi, fimbria, cc, corpus callosum. Imagen tomada de la tesis de Domínguez Escribà et al., (2009)

El GD se extiende desde el septum al lóbulo temporal y se encuentra organizado en tres capas: la capa molecular (*stratum moleculare*), la capa de células granulares (*stratum granulare*) y la capa de células polimorfonucleares que constituyen el *hilus* y delimitan la zona subgranular (ZSG) (Camacho Ugarte et al., 2020; Teyler & Discenna, 1984), esta última zona denominada el nicho neurogénico (Moreno-Jiménez et al., 2021). En la capa molecular del GD se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales (Camacho Ugarte et al., 2020; Teyler & Discenna, 1984).

En el hipocampo existe un circuito complejo de conexiones entre las neuronas de las distintas zonas del hipocampo al que se le conoce como el circuito trisináptico o sistema transversal (Figura 4), el cual inicia en la capa molecular del GD donde se da la aferencia de las fibras excitatorias de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, recibiendo información de la neocorteza frontal y temporal. Por otro lado, las células granulares del GD que son de tipo glutamatérgico hacen contacto excitatorio con las dendritas de las células piramidales de la zona CA3 del hipocampo, los axones basales de las células granulares del GD se denominan fibras musgosas (*mossy fibers* por su nombre en inglés). Posteriormente las células piramidales de CA3 se proyectan principalmente al área CA1 a través de la vía colateral de Shaffer y al núcleo septal lateral vía el fórnix; mientras que los axones de las células piramidales de CA1 entran al *alveus* y se proyectan caudalmente al subículo y rostralmente al núcleo septal lateral y la corteza prefrontal (Amaral & Witter, 1989).

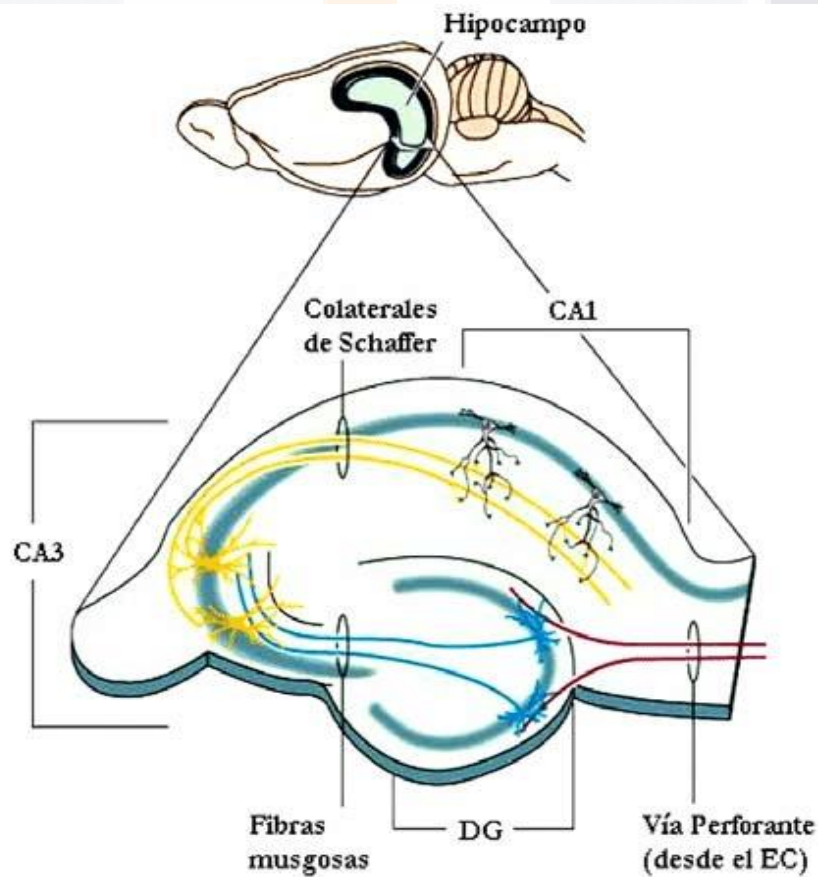


Figura 4. Circuito trisináptico del hipocampo.

Función neurogénica del hipocampo

Las características que hacen a la ZSG un nicho neurogénico son: la presencia de células pluripotenciales y la presencia de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo, sobrevivencia y migración de estas células (Camacho Ugarte et al., 2020).

Proceso neurogénico en el hipocampo del cerebro adulto

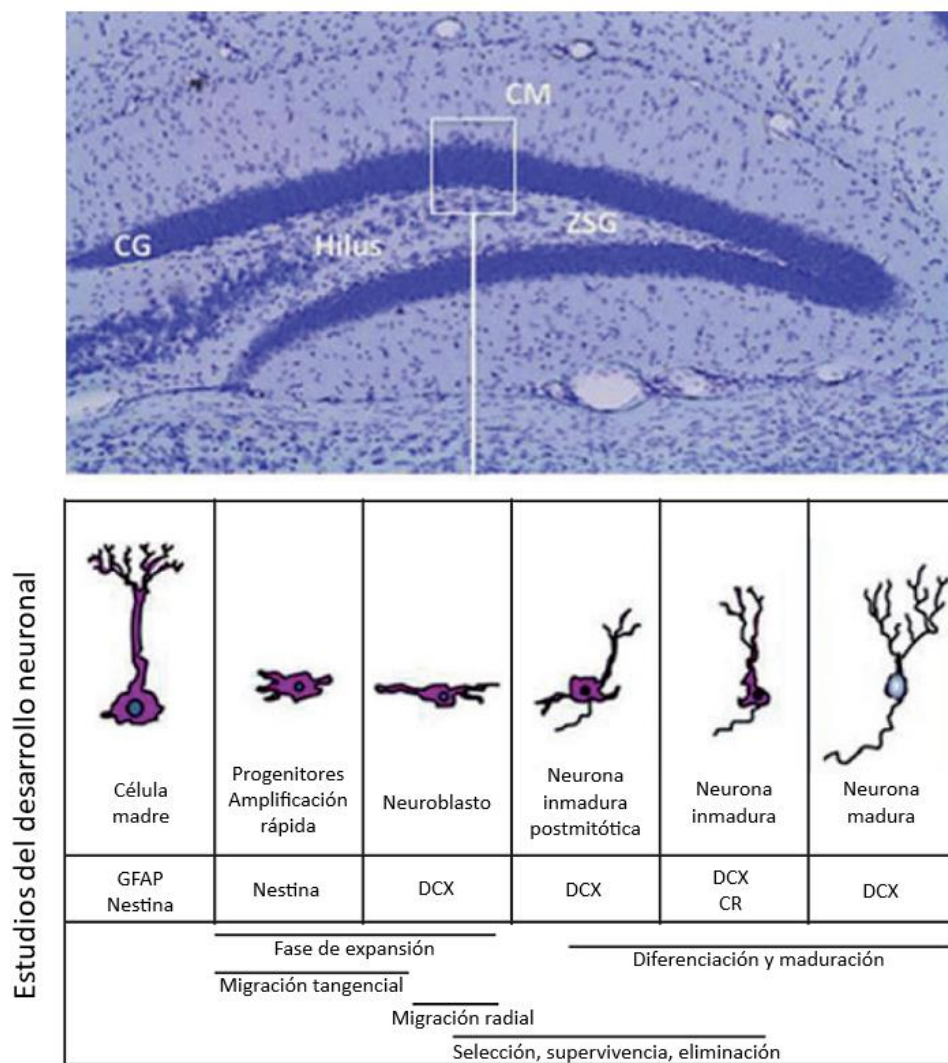


Figura 5. Formación de neuronas en el giro dentado (GD) del hipocampo. Imagen de una sección coronal teñida con violeta de cresilo donde se muestra la zona subgranular (ZSG) del GD, lugar donde se lleva a cabo el proceso neurogénico. Además, se muestran la capa granular (CG), la capa molecular (CM) y el hilus. El cuadro resalta la ZSG y la CG del GD. También se muestran representaciones de los diferentes estadios celulares del desarrollo neuronal basados en la expresión de marcadores específicos, dependiendo de la etapa del proceso neurogénico. GFAP: proteína ácida fibrilar glial, DCX: proteína de migración neuronal doblecortina. Imagen tomada de Ramírez-Rodríguez et al., (2011).

Las etapas del proceso neurogénico del hipocampo se pueden dividir en cinco: 1) Proliferación de células progenitoras neuronales; 2) diferenciación de las células progenitoras neurales mayoritariamente en neuronas y en menor cantidad en células gliales; 3) migración de las células nuevas de la ZSG hacia el giro dentado para su maduración; 4) contacto dendrítico, el cual se da a los 14 días, enviando axones hacia CA3 y contactando otras neuronas; 5) integración sináptica para la formación de células granulares maduras que interaccionarán con sus neuronas diana (Camacho Ugarte et al., 2020).

Tratamientos actuales para la hipoxia-isquemia cerebral perinatal

Como se mencionó anteriormente no existe una cura para la PC, el único tratamiento disponible para intentar disminuir el daño cerebral por la lesión hipóxico-isquémica y evitar la aparición de la PC es la hipotermia terapéutica, la cual se describirá a continuación.

Hipotermia terapéutica

La hipotermia terapéutica (HT) es el tratamiento estándar para el cuidado de bebés recién nacidos que experimentan HICP, esto se logra mediante la disminución de 3 a 4 °C de la temperatura cerebral, pues disminuye aproximadamente 5% del metabolismo cerebral por cada grado centígrado reducido (Laptook et al., 1995), retrasando así la aparición de daño por la despolarización anóxica de la neurona (Drury et al., 2014), se han reportado resultados favorables cuando la HT se lleva a cabo dentro de las primeras 6 horas después del nacimiento, con una duración no mayor a 72 horas (Lemyre & Chau, 2018).

La HT es efectiva sólo en casos de lesiones perinatales agudas como la hipoxia-isquemia neonatal, desprendimiento de placenta, oclusión umbilical, parto prolongado, prolapso del cordón umbilical, entre otras; no siendo efectiva en lesiones o daños prenatales o crónicos. Los niños que se benefician de esta terapia son bebés a término o prematuros tardíos con edad gestacional ≥ 35 semanas de gestación con hipoxia-isquemia cerebral que tienen ≤ 6 horas de vida y que cumplen al menos con dos de los siguientes criterios (Lemyre & Chau, 2018):

1. pH de muestra de sangre del cordón umbilical ≤ 7.0 , Apgar a los 5 minutos ≤ 5 o déficit de base ≥ -16 , o

2. pH de 7.01 a 7.15 o déficit de base de -10 a -15.9 en gasometría umbilical o sanguínea durante 1 hora, además de:
 - a. Antecedentes de evento agudo perinatal (como prolapso del cordón umbilical, desprendimiento de placenta o ruptura uterina, entre otros).
 - b. Puntaje Apgar ≤ 5 a los 10 minutos (Tabla 2), o al menos 10 minutos de ventilación con presión positiva.
3. Evidencia de encefalopatía moderada-severa demostrada por la presencia de convulsiones o al menos uno de los signos en tres o más de las seis categorías mostradas en la Tabla 3.

Para un mayor control, se recomienda realizar electroencefalograma de amplitud integrada durante 20 minutos, esto dentro de las primeras 48 horas para detectar trazos anormales o convulsiones, particularmente en niños con encefalopatía moderada, ya que podría ayudar a discernir casos elegibles para hipotermia terapéutica, en la Tabla 4 se describen los casos que deben excluirse o bien suspender el uso de la HT, además de los efectos secundarios más comunes.

Tabla 2. Evaluación neonatal APGAR

Acrónimo	Parámetros	Puntuación		
		0	1	2
Apariencia	Color de piel	Cianosis o palidez	Acrocianosis, tronco rosado	Rosado o sonrosado
Pulso	Frecuencia cardíaca	Ausente	<100 lpm lento	>100 lpm rápido
Gesticulación	Irritabilidad refleja	Sin respuesta	Muecas	Llanto
Actividad	Tono muscular	Flácido	Flexión de extremidades	Movimientos activos
Respiración	Esfuerzo respiratorio	Ausente	Lento e irregular	Llanto vigoroso

Tabla 2. Evaluación neonatal APGAR (*continuación*)

Interpretación del puntaje APGAR		
Depresión severa	0 - 3 puntos	RCP neonatal avanzado más medicación, monitoreo en UCI
Depresión moderada	4 - 6 puntos	Pueden ser necesarias algunas maniobras de RCP neonatal y monitoreo post recuperación
Normal	7 - 10 puntos	Recién nacido en buenas condiciones

Adaptado de Hirsh, 2014. Lpm, latidos por minuto; RCP, resucitación cardiopulmonar; UCI, Unidad de Cuidados Intensivos.

Tabla 3. Criterios para definir la encefalopatía moderada y severa

Categoría	Encefalopatía moderada	Encefalopatía severa
1. Nivel de conciencia	Letargia	Estupor/ coma
2. Actividad espontánea	Actividad disminuida	No hay actividad
3. Postura	Flexión distal, extensión completa	Descerebrado (brazos extendidos y girados internamente, piernas extendidas con los pies en flexión plantar forzada).
4. Tono	Hipotonía	Flacidez
5. Reflejos primitivos		
-Succión	Débil	Ausente
-Moro	Incompleto	Ausente
6. Sistema autónomo		
-Pupilas	Contraídas	Desviación sesgada/dilatada/ no reactivas a la luz
-Tasa cardíaca	Bradicardia	Variable
-Respiración	Respiración periódica	Apnea

Adaptado de Lemyre & Chau, 2018.

Tabla 4. Criterios de exclusión, efectos secundarios e indicaciones de suspensión de la hipotermia terapéutica

Criterios de exclusión	Efectos secundarios	Indicaciones para suspender el tratamiento
<ul style="list-style-type: none"> - Bebés moribundos -Bebés con anomalías genéticas o congénitas importantes. -Niños con restricción severa del crecimiento intrauterino. -Neonatos con coagulopatía clínica significativa -Bebés con evidencia de traumatismo craneal grave o sangrado intracraneal. 	<ul style="list-style-type: none"> -Diátesis hemorrágica -Hipotensión -Hipertensión pulmonar -Arritmias cardíacas -Bradicardia sinusal (80-100 lpm) -Trombocitopenia leve 	<ul style="list-style-type: none"> -Hipotensión a pesar del uso de inotrópicos -Hipertensión pulmonar persistente con hipoxemia -Coagulopatía clínica significativa a pesar del tratamiento anticoagulante. -Necrosis grasa subcutánea con o sin hipercalemia

Adaptado de Lemyre & Chau, 2018.

Como puede observarse en la tabla anterior, no todos los casos son elegibles para el tratamiento con HT, ni todos los pacientes sometidos a este tratamiento evitarán la aparición de un trastorno neurológico en el futuro, es por ello que actualmente se están probando nuevos tratamientos en modelos animales, como el uso de antiinflamatorios, anticonvulsivos (Celik et al., 2016; Komur et al., 2014), nanopartículas y análogos de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) con el fin de prevenir la aparición del daño cerebral (Chu et al., 2010), sin embargo hacen falta más investigaciones para que puedan aplicarse en la práctica clínica.

Papel de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el tratamiento de enfermedades neurológicas

Definición de la GnRH

La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH₂) producido por las neuronas hipotalámicas, se secreta de forma pulsátil cada 30 a 120 min en las terminaciones nerviosas de aproximadamente 1 millar de neuronas en el plexo capilar de la eminencia media hacia la hipófisis anterior, con el fin de biosintetizar y secretar las hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) de los gonadotropos hipofisarios, lo que la convierte en una hormona importante para la reproducción en los mamíferos (Millar et al., 2004). La GnRH tiene una vida media menor a 10 minutos, debido a esto se sugiere que los receptores de GnRH (GnRH-R) son reguladores autocrinos y paracrinos en otros tejidos extrapituitarios (Gründker et al., 2002; Roch et al., 2014).|

Las neuronas productoras de GnRH tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central (SNC) en el ectodermo oral y a partir de la sexta semana de gestación migran de la placoda olfatoria hacia el hipotálamo junto con una parte del nervio terminal, a través de la lámina cribiforme desde donde proyectan sus axones liberadores de GnRH hacia la eminencia media de la hipófisis como se muestra en la Figura 6 (Pozo Román & Muñoz Calvo, 2015; Prieto-Gómez & Velázquez-Paniagua, 2002).

Se han descrito dos formas de la GnRH, la forma hipotalámica GnRH-I la cual puede variar entre especies y la forma GnRH-II que se encuentra en el tejido extrahipotalámico y es altamente conservada. La GnRH-I y la GnRH-II son codificadas por diferentes genes y aunque tienen una estructura genómica similar, su distribución en los tejidos y regulación de la expresión genética son significativamente diferentes (Cheng & Leung, 2005; Prieto-Gómez & Velázquez-Paniagua, 2002). Cabe señalar que la secuencia del péptido GnRH-II se conserva en el genoma humano, sin embargo, no se ha demostrado la traducción de este; estudios en primates (chimpancés, gorila y orangután de Sumatra) sugieren que GnRH-II era un pseudogen ya que tiene una zona de paro prematura en el codón ocho de la secuencia decapeptídica (National Center for Biotechnology Information, 2019a).

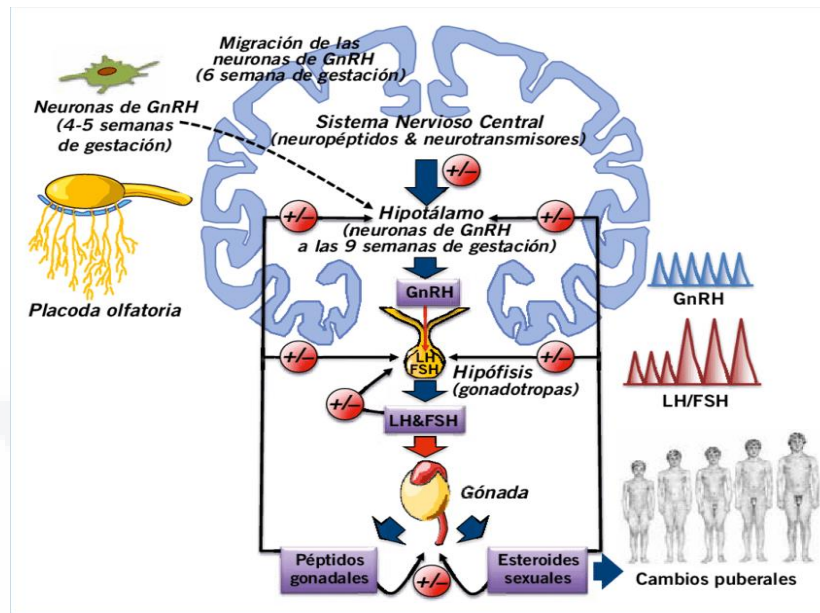


Figura 6. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Las células neurosecretoras hipotalámicas liberan la GnRH a la eminencia media de la hipófisis induciendo a los gonadotropos hipofisarios la secreción de las hormonas LH y FSH que actúan coordinadamente en las gónadas para inducir la gametogénesis, proliferación de células gonadales y la producción de los esteroides sexuales (testosterona y estrógenos), así como otros péptidos gonadales (inhibinas, activinas, folistatina) y otras hormonas circulantes (leptina), que mediante mecanismos contrarreguladores estimulan o inhiben el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: Hormona foliculoestimulante. Tomado de Prieto-Gómez & Velázquez-Paniagua, 2002

Por otro lado, el gen para GnRH-I en el humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 8 de la región 21.2, está compuesto por 4 exones y 3 intrones (National Center for Biotechnology Information, 2019b), la región de codificación del ADN de GnRH-I contiene un marco de lectura de 276 pb que codifica una proteína precursora de 92 aminoácidos. Los primeros 23 aminoácidos del precursor forman la secuencia señal y están separados por el decapeptido GnRH por dos residuos de serina. El decapeptido, a su vez, es seguido por una secuencia Gly-Lys-Arg así como un péptido de 56 aminoácidos denominado péptido asociado a GnRH (GAP). La secuencia Gly-Lys-Arg sirve para señalar la amidación del carboxilo terminal y la escisión enzimática del decapeptido de su precursor (Cheng & Leung, 2005).

Los principales sitios de escisión enzimática de la GnRH son en la posición pGlu1-His2 por la enzima piroglutamato aminopeptidasa, en la posición Tyr5-Gly6 por una endopeptidasa y finalmente en la posición Pro9-Gly10 por la enzima de escisión post-prolina (Lahlou et al., 2000).

Receptor de la GnRH

La acción de la GnRH esta mediada por su receptor, el cual pertenece a la clase A de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. En el humano sólo se ha identificado el receptor a GnRH tipo I, que al igual que en otros mamíferos, carece del carboxilo terminal citoplasmático y está conformado por 328 aminoácidos (Flanagan & Manilall, 2017), el dominio NH₂-terminal está seguido por 7 dominios α -hélice transmembranales también llamados 7TM, los cuales están unidos a tres dominios extracelulares y tres dominios intracelulares. Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los 7TM están involucrados en la unión con hormonas peptídicas como la GnRH, se cree que los dominios TM están involucrados en el cambio conformacional asociado a la activación del receptor, mientras que los dominios intracelulares están involucrados en la interacción con las proteínas G y otras proteínas para la transducción intracelular de señales (ver Figura 7) (Millar, 2005).

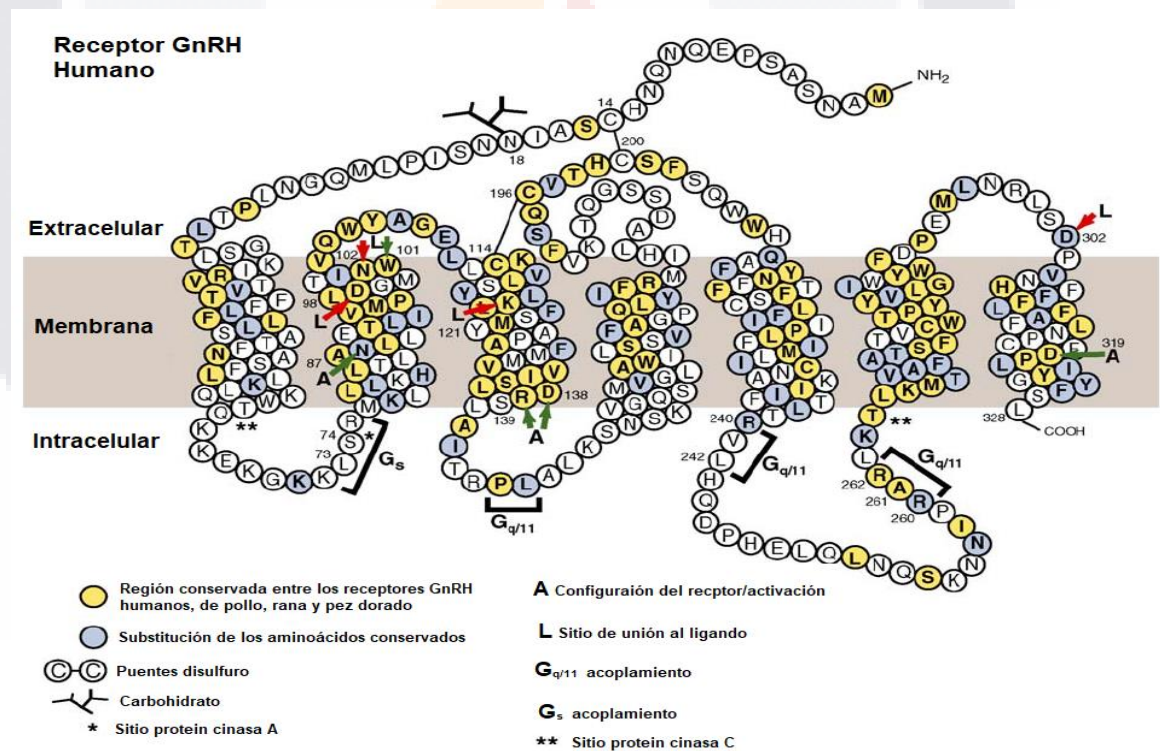


Figura 7. Representación del receptor GnRH humano. Se muestran los aminoácidos conservados entre los receptores de GnRH de vertebrados (amarillo) y las sustituciones (gris). Se indican sitios de unión a ligandos y residuos importantes en la configuración del receptor, la activación y el acoplamiento de la proteína G. También se muestran los sitios de glicosilación, fosforilación y puentes disulfuro. Adaptado de Millar, 2005.

La expresión del receptor GnRH-I es mayor en el gonadotropo de la adenohipófisis su tejido blanco, pero también se ha encontrado en otras partes del SNC como el hipotálamo, hipocampo, corteza cingular anterior, médula espinal, corteza motora, núcleo septal lateral y la amígdala (Badr & Pelletier, 1987; Calderón-Vallejo et al., 2015; Dolan et al., 2003; Jennes et al., 1997; Quintanar & Salinas, 2008), de igual forma se ha encontrado en el tejido adrenal y en células cancerígenas de mama y próstata (Deivaraju et al., 2016).

La activación del receptor para GnRH (GnRH-R) está mediada por vías autocrinas, paracrinas y endocrinas, al ser un receptor de membrana acoplado a proteínas G se debe recordar que estos receptores están conformados por tres subunidades: la alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La subunidad alfa puede unirse a GTP cuando el receptor está unido a su ligando; mientras que el dímero beta-gamma mantiene a la proteína G unida a la membrana. La proteína G activada favorece la acción de una enzima amplificadora que inicia la producción de los segundos mensajeros. Una de estas enzimas amplificadoras es el adenilato ciclasa (AC) el cual convierte el ATP en AMPc, mientras que la enzima amplificadora fosfolipasa C (PLC) corta el fosfolípido de membrana 4,5-difosfatidil inositol (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). La subunidad α tiene actividad GTPasa, por ello al pasar el tiempo la misma proteína G se inactiva debido a la degradación de GTP a GDP. El estado inactivo de la proteína G es cuando la subunidad α está unida a GDP. Cabe señalar que las proteínas G se dividen en 2 tipos, las estimuladoras (G_s y G_q) y la proteína G inhibitoria (G_i). La proteína G_s (*stimulatory G protein*) al unirse a GTP activa AC aumentando la cantidad de AMPc intracelular. La proteína G_q activa a la PLC, aumentando la cantidad de DAG, IP_3 y Ca^{2+} intracelular, finalmente la proteína G_i (*inhibitory G protein*) unida a GTP inactiva la AC, disminuyendo indirectamente la cantidad de AMPc intracelular.

Una vez entendido el funcionamiento de los receptores acoplados a proteínas G, es más fácil comprender los mecanismos de control autocrino en la secreción pulsátil de la GnRH propuestos por Krsmanovic et al., (2009), en los cuales se menciona que dependiendo de la concentración extracelular de GnRH, o bien, análogos de esta hormona, pueden activarse diferentes proteínas G específicas (Figura 8), el mecanismo autócrino del receptor GnRH se demostró en cultivos celulares de neuronas hipotalámicas immortalizadas, en las que la secreción pulsátil de GnRH es altamente dependiente del calcio y también es estimulada por el AMPc (Krsmanovic et al., 2001). Tras la activación con un agonista de la GnRH, el

acoplamiento de GnRH-R $G_{q/11}$ endógeno libera subunidades $\alpha_{q/11}$ unidas a la membrana, activando PLC- β y aumentando la señalización de inositol trifosfato/ Ca^{2+} . A la inversa, el tratamiento con antagonistas de GnRH aumenta las subunidades $\alpha_{q/11}$ asociadas a la membrana y elimina la señalización del receptor y la secreción pulsátil de GnRH. La GnRH también estimula la producción de AMPc a través de G_s , pero a altas concentraciones tienen un efecto inhibitorio debido al acoplamiento del receptor a G_i , como se muestra en la Figura 5 (Krsmanovic et al., 2009).

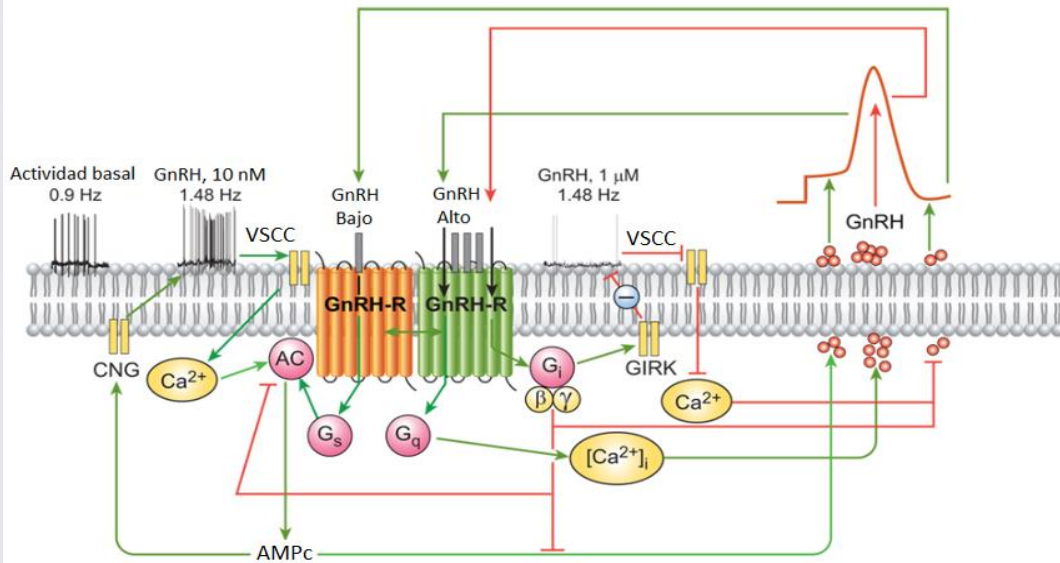


Figura 8. Mecanismo propuesto de control autocrino en la secreción pulsátil de GnRH. (1) La activación de los potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} en las neuronas GnRH promueve el influjo de Ca^{2+} , la activación del adenilato ciclasa (AC) dependiente de Ca^{2+} , el aumento de la producción de AMPc y la secreción elevada de GnRH. (2) La estimulación inducida por GnRH en el receptor endógeno específico de las neuronas productoras de GnRH activa tres proteínas G (G_s , G_q y G_i), dependiendo del tiempo y la dosis, se libera la subunidad α específica de la membrana plasmática. Esto se asocia con un aumento en la producción de inositol trifosfato y la movilización de $[Ca^{2+}]_i$, así como aumentos prominentes en la amplitud máxima de GnRH. La activación agonista de GnRH-R en las neuronas GnRH regula la actividad de AC de manera bifásica, de tal manera que la producción de AMPc se estimula a niveles de agonistas nanomolares y disminuye por concentraciones micromolares. (3) Los receptores neuronales a GnRH también interactúan con las proteínas G_i . El cambio autocrino de G_s a G_i a altas concentraciones locales de GnRH interrumpe el aumento de la neurosecreción y es seguido por una caída a la línea de base y la subsecuente reactivación de la secreción a través de las vías de señalización de Ca^{2+} /AMPc. VSCC, canales de calcio sensibles al voltaje; AC, adenilato ciclasa; CNG, canales activados por nucleótidos cíclicos; GIRK, proteína G activada hacia adentro rectificando los canales de potasio. Las líneas verdes y rojas indican acciones estimulantes e inhibitorias, respectivamente. Adaptado de Krsmanovic et al., 2009.

Referente a la regulación paracrina se ha propuesto que las kisspeptinas y su receptor, el receptor acoplado a proteína G 54 (GPR54) pueden actuar como reguladores paracrinicos de las neuronas GnRH hipotalámicas, debido a que estimulan la secreción de GnRH participando, por lo tanto, en la activación y regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Quaynor et al., 2007).

Agonistas de la GnRH

La estructura de la GnRH en los mamíferos se pliega conformacionalmente en la sexta posición, a la altura del residuo glicina, lo que favorece el acercamiento de los extremos NH₂ y COOH, permitiendo que los dominios conservados se unan al receptor y lo activen. Una vez que se ha sustituido la glicina por otro D-aminoácido hidrofóbico, la conformación de la GnRH se curva exageradamente y la afinidad de unión del ligando aumenta de 10 a 100 veces. Por ello, en la elaboración de los agonistas de la GnRH se recurre a la sustitución de un D-aminoácido en la sexta posición del decapeptido. Adicionalmente si se sustituye el residuo terminal Glicina-NH₂ con restos alquilo (como etil-amida) genera estabilidad adicional contra la escisión proteolítica sin disminuir la afinidad de unión (Blumenfeld, 2017).

Actualmente los agonistas de la GnRH se utilizan clínicamente para el tratamiento de la pubertad precoz central, endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, infertilidad en hombres, alteraciones en la secreción de GnRH y en el tratamiento de cáncer de mama y de próstata (Periti et al., 2002). En estudios recientes se ha probado su efectividad en el tratamiento de lesiones crónicas de médula espinal, encontrándose resultados satisfactorios (Quintanar et al., 2018). Algunos ejemplos de agonistas de la GnRH se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Ejemplos de agonistas de la GnRH

GnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Gly -Leu-Arg-Pro-Gly.NH ₂
Agonistas	
Acetato de leuprolida	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Leu -Leu-Arg-Pro.Net
Acetato de goserelina	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Ser -Leu-Arg-Pro-Gly.AZNH ₂
Histrelina o suprelina	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- His -Leu-Arg-Pro-Gly.NH ₂
Nafarelina	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Nal -Leu-Arg-Pro-Gly.NH ₂

Triptorelina	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Trp -Leu-Arg-Pro-Gly.NH ₂
Deslorelin	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Trp -Leu-Arg-Pro.Net
Buserelin	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- Ser -Leu-Arg-Pro.Net

NEt: N-etilamida. Adaptado Millar et al., 2004

Efecto neurotrófico de la GnRH y sus agonistas en el tratamiento de enfermedades neurológicas

Además del hipotálamo y la hipófisis, el GnRH-R se ha encontrado en otras partes del SNC, como el hipocampo (Badr & Pelletier, 1987), la corteza cerebral (Quintanar & Salinas, 2008), la médula espinal (Calderón-Vallejo et al., 2015; Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012) y células del sistema inmune como las células mononucleares, así como en timo y bazo de rata (Marchetti et al., 1989; Quintanar et al., 2011). Lo que sugiere que esta hormona tiene un papel neurotrófico y/o inmunomodulador (Quintanar & Guzmán-Soto, 2013).

En estudios con cultivos de neuronas corticales y de médula espinal de embriones de rata, la GnRH favoreció el incremento de excrecencias y la longitud de las neuritas (Quintanar et al., 2016; Quintanar & Salinas, 2008), debido a que la hormona tiene una vida media muy corta, la GnRH producida por el hipotálamo no necesariamente alcanzaría a llegar a otras partes del SNC o incluso a zonas más alejadas del cuerpo donde se ha detectado su receptor, tal es el caso de las gónadas o el bazo; sin embargo, la GnRH parece tener un efecto importante en el desarrollo de las células del SN.

La presencia del GnRH-R en otras partes del SN y su efecto neurotrófico motivó el estudio de esta hormona en lesiones medulares produciendo la mejora de la actividad locomotora, pero además ayudó en la recuperación de la micción, indicando que a pesar de que la lesión se presentó en otra zona, el efecto neurotrófico se extiende al sistema nervioso periférico; adicionalmente, la GnRH disminuyó el daño histopatológico de la lesión (Calderón-Vallejo et al., 2015; Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012). En este sentido, se probó un experimento similar utilizando un agonista de la GnRH, el acetato de leuprolida (AL), que tiene una mayor afinidad al receptor, es más resistente a la degradación enzimática y tiene un efecto más potente, por lo que se utilizaron dosis más pequeñas y espaciadas; al final del estudio se obtuvieron los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mismos resultados de recuperación de la función motora y la micción, además disminuyó el área microglial en la zona de la lesión (Díaz-Galindo et al., 2015).

Respecto al papel inmunomodulador de la GnRH y sus agonistas, se ha encontrado que en estudios con ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental el AL redujo la activación de la microglía, el factor nuclear κ B (NF- κ B), interleucinas 1 β (IL-1 β) e IL-17A (Guzmán-Soto et al., 2012, 2016).

El modelo de lesión medular probado anteriormente en ratas se migró a un ensayo clínico en el que el AL se administró durante 6 meses a pacientes con lesión crónica de la médula espinal, al finalizar el estudio se obtuvieron resultados alentadores en la recuperación de la función motora y sensitiva de los pacientes, además algunos pacientes refirieron haber presentado mejoras en los movimientos intestinales, lo que ayudó a la evacuación de las heces, ya que estos pacientes sufren de problemas crónicos de estreñimiento, situación que limita su calidad de vida e independencia (Quintanar et al., 2018).

Justificación

La HICP es una condición que predispone la aparición de PC, una discapacidad que permanece durante toda la vida afectando la función motora y cognitiva. Una vez establecido el daño cerebral, no existe ningún tratamiento que corrija la lesión.

En estudios previos en los que se han utilizado agonistas de la GnRH se han observado mejoras en la función motora y disminución de la respuesta inflamatoria en lesiones medulares. Por otro lado, en un modelo en ratas de hipoxia-isquemia cerebral el agonista de la GnRH atenuó la apoptosis de neuronas en el hipocampo, estructura que es muy susceptible al daño por hipoxia-isquemia.

Debido a lo antes mencionado, es importante realizar un estudio en el que se analice el efecto del AL en la regeneración de la función motora y cognitiva en un modelo de parálisis cerebral inducido por lesión hipóxico-isquémica, de obtenerse los resultados esperados se favorecería el desarrollo de terapias novedosas para el tratamiento de la discapacidad motora y cognitiva causadas por la PC.

Hipótesis

El acetato de leuprolida (AL) favorece la recuperación motora y cognitiva en un modelo de parálisis cerebral en ratas neonatas sometidas a hipoxia-isquemia cerebral perinatal.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Evaluar el efecto del acetato de leuprolida (AL) en un modelo de parálisis cerebral en ratas neonatas sometidas a hipoxia-isquemia cerebral perinatal.

Objetivos específicos

- Estandarizar la lesión por hipoxia-isquemia en ratas de 7 días postnatales.
- Evaluar el efecto del AL en las funciones motoras de ratas con parálisis cerebral.
- Evaluar el efecto del AL en las funciones cognitivas de ratas con parálisis cerebral.
- Analizar el efecto del AL en regeneración neuronal en el hipocampo y corteza motora de ratas con parálisis cerebral.
- Estudiar el efecto del AL en la respuesta inflamatoria en hipocampo y corteza motora de ratas neonatas con parálisis cerebral
- Realizar el análisis histológico del área de lesión cerebral de ratas con parálisis cerebral

Material y Métodos

Sujetos

Se utilizaron 78 ratas Wistar de ambos sexos, de 7 días postnatales (7PN), las cuales se asignaron aleatoriamente en 3 grupos: sham, hipoxia-isquemia cerebral más solución salina (SS), e hipoxia-isquemia cerebral más acetato de leuprolida (AL). Los animales se alojaron en las instalaciones del bioterio del Centro de Ciencias Básicas de la universidad en condiciones controladas de luz (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas) y temperatura (21–24 °C). Todos los

procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con lo establecido en las “Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del Instituto Nacional de Salud (National Research Council of the National Academies, 2011); además, el presente protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En la Figura 9 se puede observar las diferentes pruebas que se llevaron a cabo a lo largo del estudio.



Figura 9. Línea del tiempo experimental

Procedimiento para generar la lesión por hipoxia-isquemia

Las cirugías se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, siguiendo la técnica modificada de Rice, Vannucci, & Brierley (1981), la cual se describe a continuación: se anestesió a cada animal mediante hipotermia colocando a las ratas de 7 días post natales (PN) en hielo durante 15 a 18 minutos, se verificó que el animal estuviera completamente sedado mediante la ausencia total de movimiento de retirada de la pata o la cola tras una punción; posteriormente se realizó una incisión en la línea media del cuello, localizando la arteria carótida común derecha (ACCD), la arteria se separó del nervio vago y se le realizó una doble ligadura con hilo de nylon 8-0 y posteriormente se cortó como se observa en la Figura 10. Para las ratas sham se siguió el mismo procedimiento con excepción

de la ligadura y corte de la ACCD; finalmente se cerró la herida con unas gotas de pegamento quirúrgico para la sutura de la piel y cada cría se marcó en el dorso con tinta indeleble para su posterior identificación.

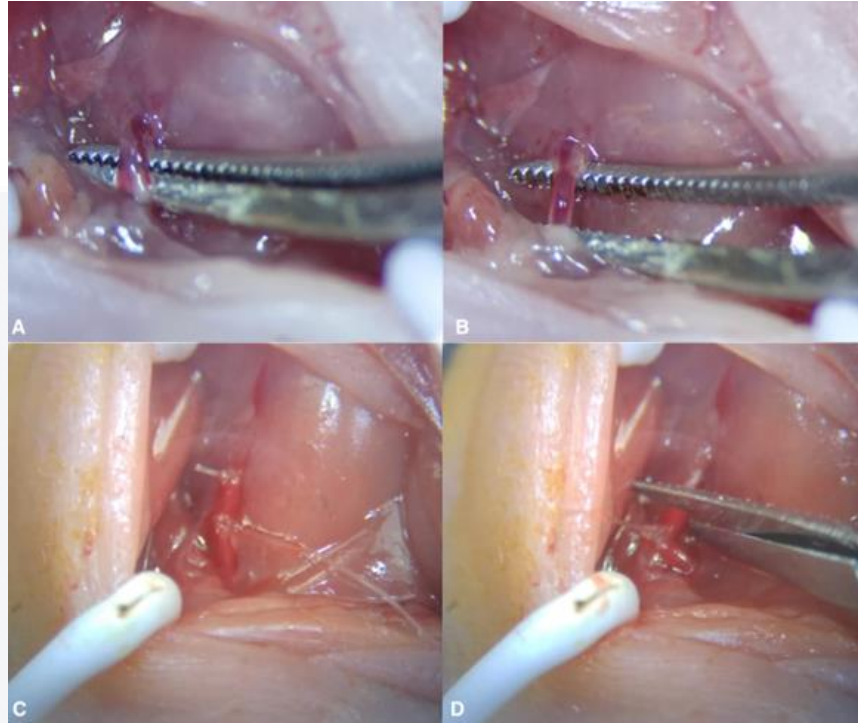


Figura 10. Técnica utilizada para lesión isquémica en ratas de 7 días posnatales. (A) Localización de la arteria carótida común derecha (ACCD), (B) Separación de la ACCD del nervio vago, (C) Doble ligadura de la ACCD, (D) Corte de la ACCD para limitar el flujo de sangre al cerebro.

Después de la cirugía, todos los cachorros se devolvieron a sus madres para recuperación y recibir de 90 a 120 min de alimentación; posteriormente se sometieron a una atmósfera hipóxica con una concentración de oxígeno del 8% y balance de nitrógeno del 92% a un flujo de 3 L/min durante 60 min, las ratas permanecieron durante este tiempo en una cámara parcialmente inmersa en agua a 37 °C para mantener la temperatura constante (Figura 11), mientras que las ratas sham fueron separadas de su madre y aisladas por el mismo periodo de tiempo pero estuvieron expuestas al aire ambiental; finalmente todas las crías fueron devueltas a su madre hasta el destete en el día postnatal 21 (P21), a partir de este día las ratas recibieron una dieta estándar Lab Diet-5001 (contiene 28.7% de proteína, 13.4% de grasa y 57.9% de carbohidratos) y se favoreció el enriquecimiento ambiental proporcionando rollos de cartón y semillas de girasol.



Figura 11. Inducción de la lesión hipóxica. A) Colocación de las ratas en un recipiente que fue herméticamente cerrado y colocado en un baño maría, (B) Administración de una atmósfera hipóxica mediante el uso de un gas con una concentración de 8% de oxígeno y balance de nitrógeno al 92%.

Tratamiento

El tratamiento se inició el mismo día de la HICP y continuó durante 35 días siguiendo el esquema reportado por Guzmán-Soto et al., (2012) y Díaz-Galindo et al., (2015); en el grupo de ratas tratadas con AL se inició con una dosis intramuscular de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AL en un volumen total de 25 μl por 3 días consecutivos, posteriormente se administró el fármaco dejando dos días de descanso antes de la siguiente dosis y esto se llevó a cabo durante 5 semanas. En el grupo de ratas con SS se administró la misma dosis, pero de solución salina y siguiendo el mismo esquema de tratamiento; ambos grupos se pesaron semanalmente para realizar ajustes de la dosis.

Evaluación de la Función Motora

La evaluación motora comenzó el día PN8 y concluyó el día PN 41, durante la primera semana de evaluación se utilizó la batería propuesta por Feather-Schussler & Ferguson (2016) adaptada para rata, en la cual se aplicaron las pruebas de evaluación del ángulo de extremidades posteriores y reflejo de enderezamiento sobre una superficie, mientras que la prueba de campo abierto se aplicó en los días posnatales 27 y 33 y la prueba de rota rod se aplicó los días

posnatales 37 a 41. Durante las pruebas las ratas fueron videograbadas para el posterior análisis de la función motora.

Evaluación del ángulo de extremidad posterior

Hay un cambio aparente en el desarrollo de la postura de las patas traseras a medida que la rata madura de arrastrarse a andar, donde las extremidades traseras se colocan debajo del cuerpo al caminar y el ángulo entre las extremidades posteriores es menor que el ángulo observado al arrastrarse. A pesar de que el ángulo del pie de la extremidad posterior cambia con el tiempo, se pueden comparar crías de rata de la misma edad con diferentes lesiones o enfermedades. En esta prueba no hay potencial para el aprendizaje, por lo tanto, la prueba del ángulo de las extremidades posteriores se aplicó los días posnatales 8, 9 y 10, es decir a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la lesión hipóxico-isquémica en el caso de los grupos SS y AL. A continuación, se describe la técnica utilizada para la evaluación del ángulo de extremidad posterior:

1. Se colocó a las ratas en una pasarela y se montó una cámara de video que grababa lateralmente al animal y de abajo hacia arriba mientras se movía. Se empujó suavemente a cada cachorro tocando su cola para motivarlo a caminar. La grabación duró 3 minutos.
2. Usando las grabaciones de video, se midió el ángulo de las extremidades posteriores de los cachorros dibujando una línea desde el final del talón/espínilla hasta la punta del dedo más largo (centro) utilizando el software *Tracker Video Análisis and Modeling Tool* versión 6.1.1 para Windows. Solo se tomó la medida cuando el cachorro estaba realizando una zancada completa en línea recta y ambos pies estaban apoyados en el piso. No se tomaron medidas mientras el cachorro estuvo parado o mientras estaba girando.
3. Se midieron cinco series de ángulos de pie y se calculó el ángulo promedio para cada cría examinada (Figura 12).

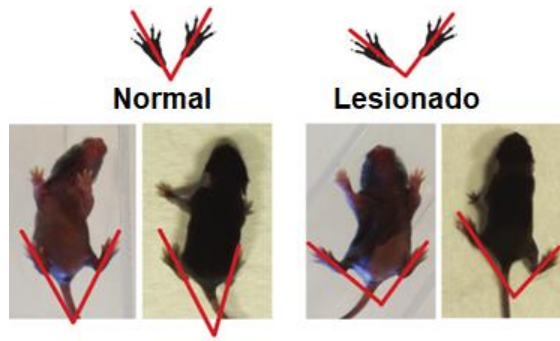


Figura 12. Evaluación de la posición de las patas posteriores

Evaluación del reflejo de enderezamiento

Para la evaluación del reflejo de enderezamiento se colocó a los cachorros sobre su espalda y se les mantuvo en esa posición durante 5 segundos, en seguida se les liberó y se registró el tiempo que tardó en regresar a la posición prona (Figura 13), así como la dirección de enderezamiento (izquierda o derecha) utilizando el software *Tracker Video Análisis and Modeling Tool* versión 6.1.1 para Windows. El ensayo se repitió en 3 ocasiones con duración máxima de 1 minuto y se clasificó el desempeño de las ratas de acuerdo con la siguiente escala: Puntaje 0, sin respuesta; puntaje 1, cuando el animal se enderezó en un tiempo mayor a 1 segundo; puntaje 2, cuando se enderezó en menos de 1 segundo.



Figura 13. Evaluación del reflejo de enderezamiento

Prueba de campo abierto

Para evaluar la actividad motora, exploratoria y ansiolítica se utilizó la prueba de campo abierto en los días postnatales 27 y 33. Cada rata se colocó durante 5 minutos para que explorara libremente en una caja de acrílico de 44 cm de ancho x 44 cm de largo x 50 cm de altura de la marca *Panlab Harvard Apparatus* que contaba con un actímetro infrarrojo para la detección

del movimiento. Para el análisis se dividió digitalmente el campo abierto en dos zonas: la zona central (ZC) que comprendía un cuadrado central de 24×24 cm y una zona periférica alrededor (ZP).

Posteriormente se analizó la actividad de la rata con el Software *ACTITRACK* versión 2.7 para determinar la distancia recorrida, el tiempo de exploración, la velocidad, la tigmotaxis (localización de la rata en la periferia) así como el número de veces que la rata se irguió en dos patas o *rearings* tanto en la zona central como periférica de la caja, en la Figura 14 se muestra el equipo utilizado para el análisis del campo abierto.

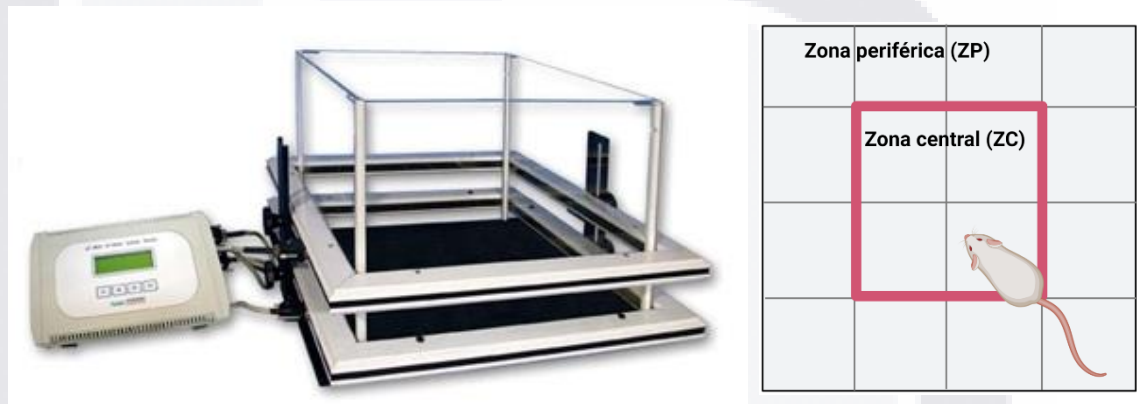


Figura 14. Campo abierto adaptado con actímetro por detección infrarroja del movimiento y ejemplificación de la división de la arena para el análisis de datos.

Prueba de Rota Rod

Esta prueba se utilizó para evaluar la coordinación sensoriomotora en los días 37 a 41 postnatal. Para la correcta interpretación de los datos primero se llevó a cabo una sesión de habituación en el día 37 postnatal durante 2 min a baja velocidad (4 rpm) y en caso de que la rata cayera se colocó nuevamente hasta que lograra permanecer 60 segundos en el rodillo. Posteriormente, se llevó a cabo la prueba los 4 días consecutivos con 3 repeticiones cada día, dejando descansar al animal por lo menos 3 minutos entre cada prueba, en dicha prueba la velocidad se incrementó de 4 a 40 rpm en un rango de 300 segundos, en caso de caída de la rata en menos de 30 segundos de iniciada la prueba se repitió. El equipo utilizado durante la prueba fue el Rota Rod de la marca *Panlab Harvard Apparatus* modelo 76-0772 (Figura 15) y para la extracción de datos se utilizó el software *SEDACOM* versión 2.0.



Figura 15. Rota rod utilizado para evaluar la coordinación motora

Evaluación de la Función Cognitiva

La evaluación cognitiva se inició los días 34 y 35 posnatal (etapa juvenil) y consistió en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso y la prueba de reconocimiento de lugar, mientras que el día 36 posnatal se realizó la prueba del laberinto en “Y”.

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

Los días postnatales 34 y 35 se llevó a cabo la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en 50 ratas 16 del grupo sham, 17 de SS y 17 de AL. Un día previo a la prueba se llevó a cabo la habituación de los animales en la misma superficie utilizada para la prueba de campo abierto. En el día postnatal 34, se colocaron dos objetos idénticos en la superficie (latas o frascos de plástico), posteriormente se dejó que la rata explorara libremente durante 5 min. Después de un intervalo de retención de 24 horas, uno de los objetos fue reemplazado por uno nuevo en la misma ubicación. Se permitió nuevamente que la rata explorara libremente durante 5 min como se muestra en la Figura 16. Las ratas son capaces de retener el objeto familiar durante al menos 24 horas a esta edad. Todas las sesiones de prueba fueron videograbadas y calificadas fuera de línea en el programa *Lince* (software de uso gratuito diseñado por la Universidad de Lérida) (Soto et al., 2019). El tiempo que la rata pasó investigando cada objeto fue registrado.

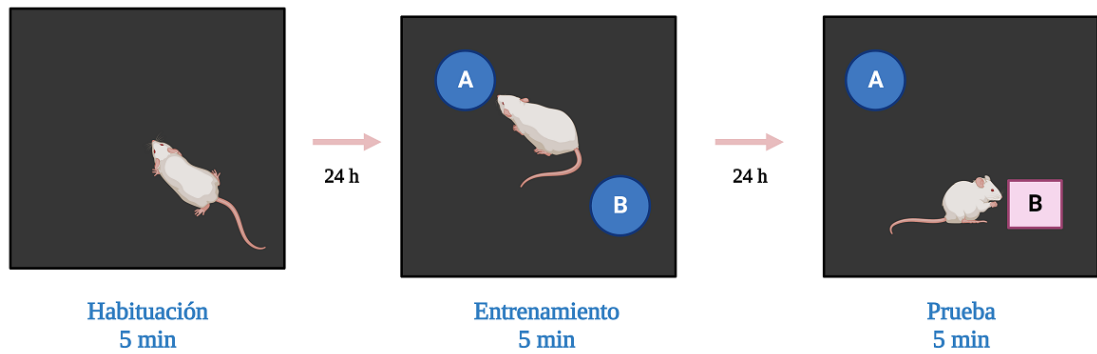


Figura 16. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

Para que se considerara exploración de objetos, la rata tuvo que estar tocando ya sea con sus patas o bien con las vibrisas u olfateando el objeto y no mirando a otra parte. Los datos se presentaron como “porcentaje total de investigación” y “discriminación relativa” al calcular las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ total de investigación} = \frac{\textit{T tiempo empleado en explorar el objeto novedoso}}{\textit{T tiempo total en explorar ambos objetos}}$$

Un “porcentaje total de investigación” por arriba del 50% indica que las ratas pasaron más tiempo investigando del objeto novedoso.

$$\textit{Discriminación relativa} = \frac{\textit{T tiempo con objeto novedoso} - \textit{t tiempo con objeto familiar}}{\textit{T tiempo total en explorar ambos objetos}}$$

Respecto a la “discriminación relativa” una proporción de 0 significó que las ratas pasaron la misma cantidad de tiempo con ambos objetos. Una proporción positiva significa que la rata pasó más tiempo investigando el objeto novedoso (Denninger et al., 2018).

Prueba de reconocimiento de lugar

En otro grupo de ratas se realizó la prueba de reconocimiento de lugar los días postnatales 34 y 35, es decir, durante la tercera semana de tratamiento. Para la prueba se incluyeron 24 ratas, 8 del grupo sham, 5 del grupo SS y 8 del grupo AL. Un día previo a la prueba se realizó la habituación de los animales en la misma superficie utilizada para la prueba de campo abierto.

Para la realización de la prueba de reconocimiento de lugar, el día 34 postnatal se colocaron dos objetos en la superficie (latas o frascos de plástico). Se dejó que la rata explorara libremente durante 10 min, tras un intervalo de retención de 24 horas, se cambió uno de los objetos de lugar y se permitió que la rata explorara libremente durante 10 min como se muestra en la Figura 17. Todas las sesiones fueron videograbadas y calificadas fuera de línea en el programa *Lince*. El tiempo que la rata pasó investigando cada objeto fue registrado.



Figura 17. Prueba de reconocimiento de lugar

Para que se considerara exploración de objetos, la rata tuvo que estar tocando ya sea con sus patas o bien con las vibrisas u olfateando el objeto y no mirando a otra parte. Los datos se presentaron como “porcentaje total de investigación” y “discriminación relativa” con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ total de investigación} = \frac{\text{Tiempo explorando nueva localización}}{\text{Tiempo total en explorar ambos objetos}}$$

Un “porcentaje total de investigación” por arriba del 50% indica que las ratas pasaron más tiempo investigando el objeto con una nueva localización.

Discriminación relativa

$$= \frac{\text{Tiempo con objeto en nueva localización} - \text{tiempo con objeto en localización familiar}}{\text{Tiempo total en explorar ambos objetos}}$$

Respecto a la “discriminación relativa” una proporción de 0 significó que las ratas pasaron la misma cantidad de tiempo explorando ambos objetos. Una proporción positiva significa que la

rata pasó más tiempo investigando el objeto con una localización nueva (Denninger et al., 2018).

Prueba de Laberinto en Y

Para evaluar la memoria espacial a corto plazo se realizó la prueba de laberinto en Y (Ijomone & Biose, 2019; Postu et al., 2019) en 22 animales, de los cuales 7 fueron del grupo sham, 7 del grupo de SS y 8 del grupo de AL; en esta prueba se midió el comportamiento de la alternancia espontánea de las ratas en una sola sesión el día postnatal 36, es decir en la cuarta semana de tratamiento. Se consideró los animales con mejor desempeño a los de mayores porcentajes de alternancia, ya que podían recordar el brazo donde habrían estado antes. Para ello, se colocaron las ratas en uno de los brazos del laberinto y se les dejó explorar libremente por 10 min. La entrada sucesiva en cada brazo fue considerada como una conducta de alternancia, donde las patas traseras del animal deben estar dentro de un brazo para considerar la entrada al mismo. Cabe señalar, que el laberinto contaba con señales visuoespaciales en cada brazo.

Cuando las ratas ingresaron a los tres brazos del laberinto (tripletes) se definió como alternancia espontánea. La alternancia espontánea se calcula como un porcentaje del número de alternancias registradas utilizando la siguiente fórmula: $[\text{número de alternancias} / (\text{total de entradas} - 2)] \times 100$.

El laberinto en Y contó con las siguientes dimensiones: 25 cm de alto, 35 cm de largo y 10 cm de ancho para cada brazo y un área central triangular equilátera (Figura 18). La prueba fue videograbada y posteriormente los videos adquiridos fueron analizados con el software *SMART* versión 3.0 de Panlab (Barcelona, España), para rastrear el desplazamiento de cada animal.

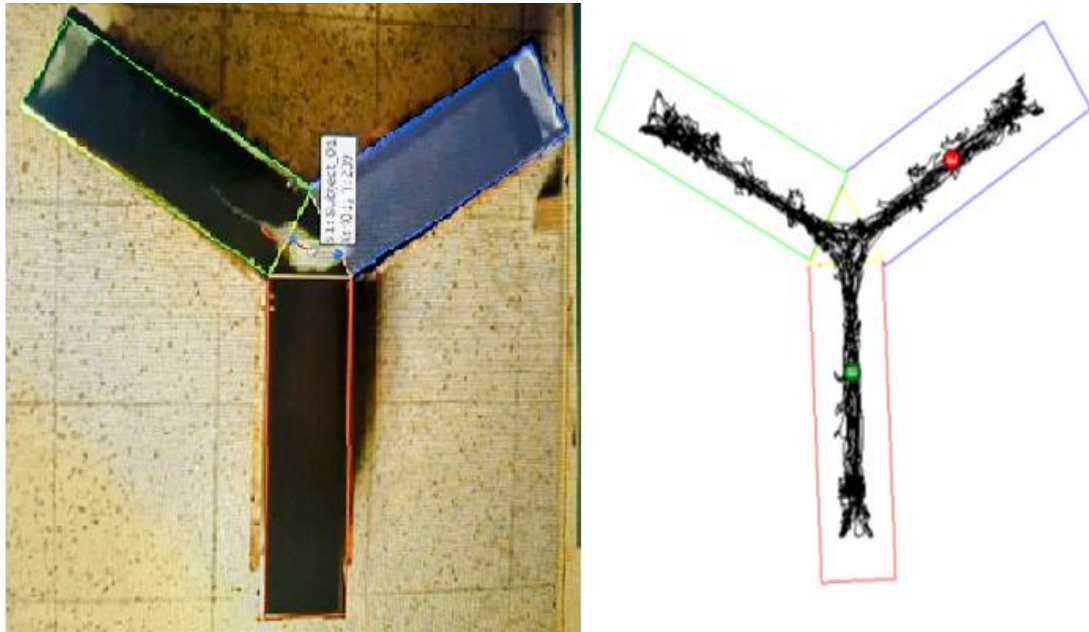


Figura 18. Laberinto en Y utilizando el software SMART para registrar el desplazamiento del animal.

Evaluación histológica y molecular

Evaluación histológica para la estandarización de las cirugías

Para la estandarización de las cirugías se llevó a cabo la tinción con cloruro de tetrazolio (TTC) a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la lesión por hipoxia-isquemia cerebral perinatal.

Primero se estandarizó el tiempo de la hipoxia y el flujo al que sería administrada la mezcla de gases, para ello se utilizaron 6 ratas de 7 días posnatales las cuales se dividieron en 2 grupos, ambos se anestesiaron mediante hipotermia durante 15 minutos y posteriormente se realizó la cirugía de Rice y Vannucci previamente descrita, la hipoxia se probó a un flujo de 3 L/min durante 60 min y a 5 L/min durante 90 min en una cámara parcialmente inmersa a 37 °C. Para verificar el daño se sacrificaron las ratas a las 24 horas y se realizaron 3 cortes coronales de los cerebros, posteriormente se tiñeron con cloruro de tetrazolio dando una coloración rosada en el tejido sano mientras que la zona lesionada se veía blanca (Taniguchi & Andreasson, 2008). Las áreas de lesión se midieron en cada corte utilizando el programa Image J.

Evaluación de la respuesta inflamatoria por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

72 horas posterior a la lesión hipóxico-isquémica se realizó el sacrificio de las ratas mediante anestesia profunda y se realizó una perfusión transcardiaca con 15 ml solución salina al 0.9 %. Los cerebros fueron rápidamente disecados y se separó la corteza e hipocampo ipsilateral a la lesión, las muestras fueron conservadas en 600 µl de DNA/RNA Shield (Zymo Research, CA, USA) a -80°C hasta su procesamiento. El RNA se extrajo utilizando el kit de extracción GeneJet RNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, K0731). La concentración y calidad de la muestra se midió mediante espectrometría con Nanodrop, solo la absorbancia OD 260/280 > 1.8 fue utilizada. Posteriormente, a partir de 50 ng de RNA total se estableció la síntesis de cDNA y qPCR en un solo paso utilizando del kit SuperScript® III Platinum® SYBR Green® One Step qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA). Los oligonucleótidos fueron diseñados y referenciados de la siguiente manera:

Beta-Actina: NM_031144.3	Fw-β-Actina: GTCGTACCACTGGCATTGTG Rv-β-Actina: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
TNF-alfa: NM_012675.3	Fw-TNF-α: AACACACGAGACGCTGAAGT Rv-TNF-α: TCCAGTGAGTTCCGAAAGCC
IL-1beta: NM_031512.2	Fw-IL1β: ATGGCAACTGTCCCTGAACT Rv-IL1β: CGAGATGCTGCTGTGAGATT
IFN-gamma: NM_138880.3	Fw-IFN-γ: TCGAGGTGAACAACCCACAG Rv-IFN-γ: CTACCCCAAGAATCAGCACCG
CXCL1: NM_030845.2	Fw-CXCL1: GCACCCAAACCGAAGTCATAG Rv-CXCL1: TGTTGTCAGAAGCCAGCGTT

La RT-PCR cuantitativa se desarrolló en un equipo StepOne (Applied Biosystems, USA) y se programó el funcionamiento del equipo a 50 °C, 3 min; 95 °C, 5 min; y 40 ciclos de 95 °C, 15 min; 60 °C, 30 s; y finalmente 40 °C 1 min. El nivel de expresión de β-actina se utilizó como control interno. El valor umbral de fluorescencia (valor Ct) se analizó mediante un ciclo de umbral comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y normalizado con el grupo sham. Las expresiones se calcularon y expresaron como veces de cambio normalizado con el grupo sham.

Evaluación de la respuesta inflamatoria por western blot

Para evaluar la respuesta inflamatoria mediante western blot se sacrificaron los animales 72 horas posterior a la lesión hipóxico-isquémica mediante sacrificio con anestesia profunda y perfusión transcardiaca con 15 ml de solución salina al 0.9 %. Los cerebros fueron rápidamente disecados y se separó la corteza del hipocampo ipsilateral a la lesión (del hemisferio derecho), las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

Para el procesamiento, los tejidos fueron sonicados en frío utilizando un Procesador Ultrasónico GE130 en 200 µl de buffer de lisis que contenía 20 mM de Tris/HCl, 1 mM PMSF, 10 mM MgCl₂, los inhibidores de proteasas al 0.6 mM de aprotinina y 2 µM de leupeptina, adicionalmente se agregó el inhibidor de fosfatasas Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Después los lisados fueron centrifugados a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C.

La concentración de proteínas se midió utilizando el kit *BCA protein assay* (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Posteriormente cantidades iguales de proteína total (25 µg) fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 13%. Las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilion-P Transfer Membranes, Merck Millipore Ltd., Ireland) y después fueron cortadas y bloqueadas durante 1 hora con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS) a temperatura ambiente en agitación constante, finalmente las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios que se enlistan en la Tabla 7.

Tabla 6. Anticuerpos primarios para evaluar la respuesta inflamatoria

Anticuerpo	Dilución	Huésped	Marca	#Catálogo
IκB-α	1:1,000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-1643
p-IκB-α	1:500	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-8404
GAPDH	1:10,000	Rabbit	Sigma-Aldrich	G9545

El anticuerpo para GAPDH se utilizó como control interno. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron e incubaron con los anticuerpos secundarios que se enlistan en la Tabla 8.

Tabla 7. Anticuerpos secundarios para evaluar respuesta inflamatoria

Anticuerpo	Dilución	Marca	#Catálogo
Anti-mouse	1:5,000	Zymed	816520
Anti-rabbit	1:5,000	Zymed	816120

Se rebelaron las membranas usando el Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, 1705060) en un fotodocumentador marca MicroChemi 4.2 (Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel). Para medir la densidad de las proteínas se utilizó el software Biorad Image Lab 6.1. El análisis semicuantitativo se realizó normalizando el nivel de expresión de cada proteína al del control interno y posteriormente se expresó como veces de cambio normalizado con el grupo sham (Pillai-Kastoori et al., 2020).

Evaluación de la neuroregeneración por western blot

Para la evaluación de proteínas estructurales se sacrificó a los animales el día posnatal 42, después de 5 semanas de tratamiento. El sacrificio se llevó a cabo mediante sobredosis con pentobarbital sódico y posteriormente se realizó la perfusión transcardiaca con 60 ml de solución salina al 0.9 %. Los cerebros fueron rápidamente disecados y se separó la corteza y el hipocampo ipsilateral a la lesión, las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento. El procesamiento fue el mismo descrito en el apartado anterior, sólo no se incluyó el inhibidor de fosfatasas en el buffer de lisis. Los anticuerpos primarios que se utilizaron se enlistan en la Tabla 9.

Tabla 8. Anticuerpos primarios para evaluar daño estructural

Anticuerpo	Dilución	Huésped	Marca	#Catálogo
Neurofilamentos-200	1:1,000	Mouse	Sigma-Aldrich	N0142
Spinophilin/Neurabin II	1:1,000	Rabbit	Abcam	Ab18561
MAP-2	1:500	Mouse	Invitrogen	13-1500
MBP	1:1,000	Rabbit	Sigma-Aldrich	M3821
GAPDH	1:10,000	Rabbit	Sigma-Aldrich	G9545

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los mismos descritos previamente en la Tabla 8 y el GAPDH se utilizó como el control interno para el análisis semicuantitativo normalizando

el nivel de expresión de cada proteína, posteriormente se expresaron las proteínas como veces de cambio normalizado con el grupo sham (Pillai-Kastoori et al., 2020).

Evaluación histológica de la lesión por hipoxia-isquemia cerebral perinatal

A los 42 días postnatales se realizó el sacrificio de las ratas mediante sobredosis con pentobarbital sódico y se realizó la perfusión transcardiaca con 60 ml de solución salina al 0.9% seguido de 40 ml de formalina neutra al 10%. Los cerebros se dejaron en formalina durante 2 semanas y después se incluyeron en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes coronales del encéfalo de 3 µm de espesor a la altura del hipocampo para valorar las diferencias morfológicas utilizando la tinción con hematoxilina & eosina.

Para la adquisición de las fotografías se utilizó un microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con una cámara de video de alta resolución. Se tomaron fotografías a 10× ~ 400× de la circunvolución dentada o giro dentado (GD) del hipocampo del hemisferio derecho, el cual se dividió en 5 zonas como se muestra en la Figura 19. Las fotografías fueron procesadas utilizando el software AmScope y se realizó el conteo manual de las neuronas.

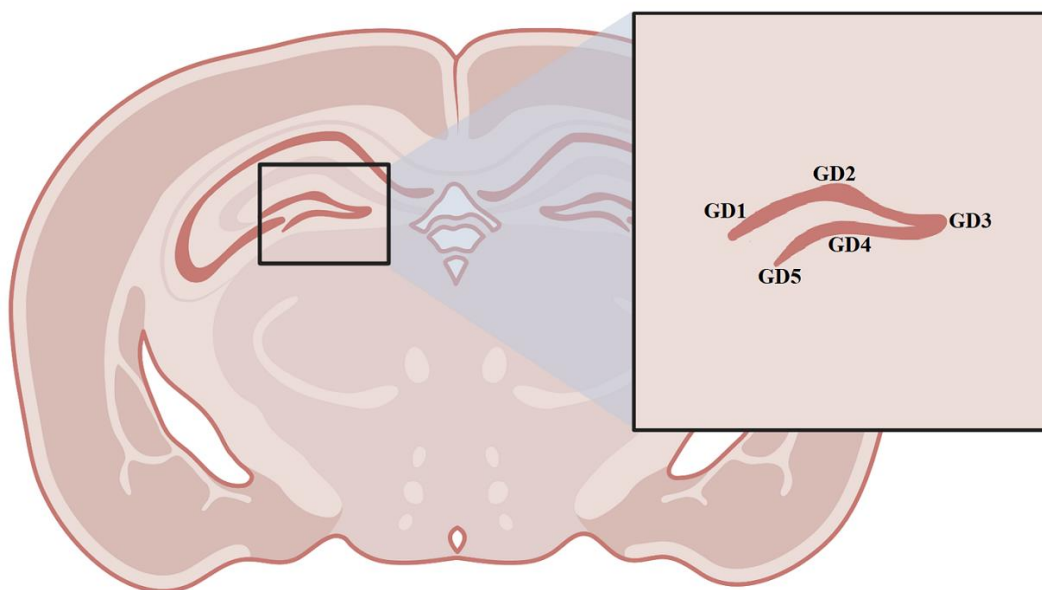
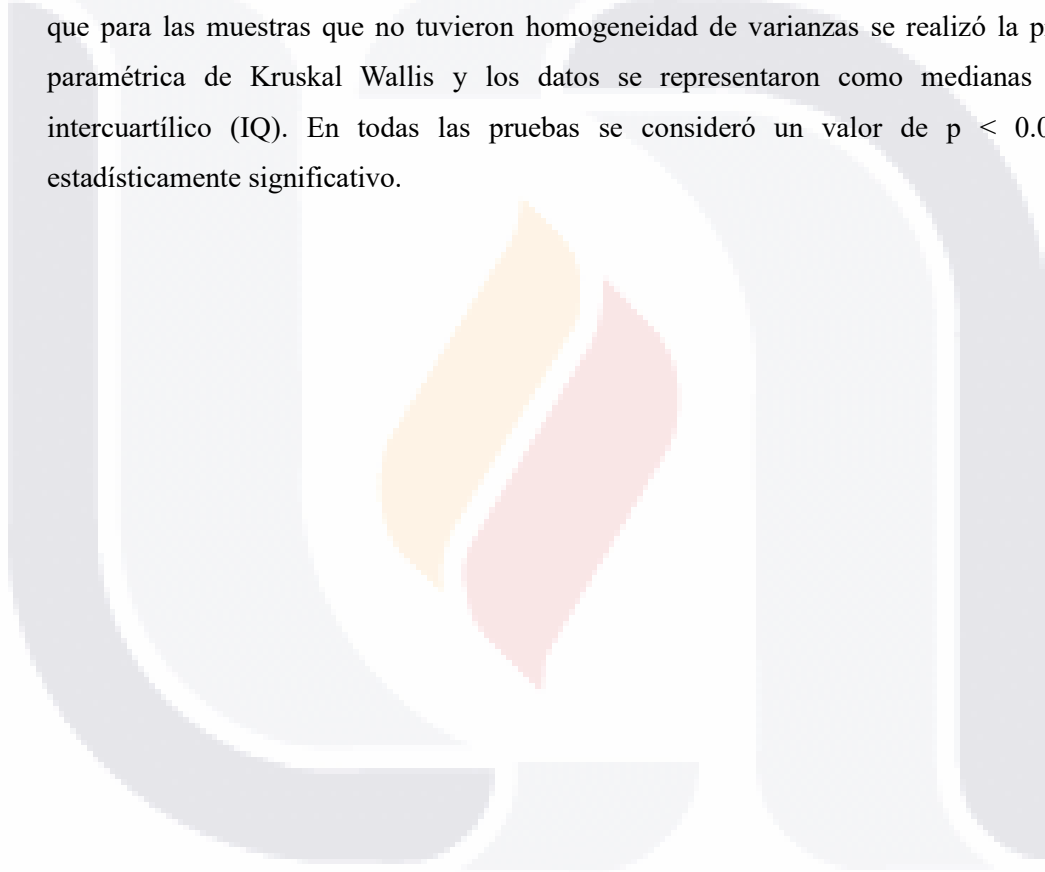


Figura 19. Áreas de interés para el análisis morfométrico del hipocampo

Análisis estadístico

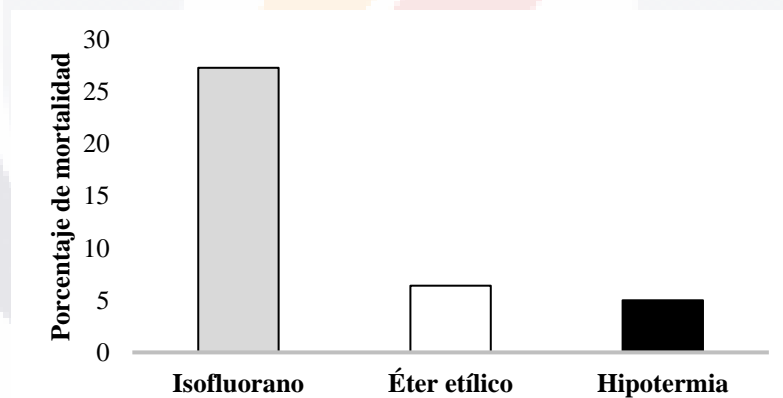
Para el análisis estadístico se utilizó el software Prisma versión 9.0 para Windows. Se verificó la distribución de las variables cuantitativas mediante la prueba de Shapiro Wilk y se utilizó la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas, aquellas variables que tuvieron varianzas similares se analizaron mediante comparaciones múltiples utilizando la prueba de ANOVA seguida de una prueba post-hoc de Tukey, los valores de las variables se representaron con medias \pm desviación estándar (DE) o como medias \pm error estándar. Mientras que para las muestras que no tuvieron homogeneidad de varianzas se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y los datos se representaron como medianas y rango intercuartílico (IQ). En todas las pruebas se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.



Resultados

Estandarización de la cirugía por hipoxia isquemia cerebral perinatal

Se llevó a cabo la estandarización de la cirugía hipóxico-isquémica en ratas neonatas de 7 días posnatales. Inicialmente se seleccionó el anestésico más adecuado para llevar a cabo la cirugía, se comparó el isoflurano, éter etílico e hipotermia. Se realizaron un total de 118 cirugías, en 11 de ellas se utilizó isoflurano como anestésico con una mortalidad del 27.3 %, en uno de los casos la madre se comió a su cría y en los otros casos fue difícil mantener la anestesia estable puesto que no se cuenta con una cámara de anestesia representando un riesgo para el personal que desarrolla la técnica quirúrgica; para el éter etílico se realizaron 47 cirugías con un porcentaje de mortalidad del 6.4 % y finalmente 60 ratas fueron anestesiadas mediante hipotermia teniendo una mortalidad del 5 % (Gráfica 1), debido a que el éter etílico y la hipotermia tuvieron resultados similares en el porcentaje de mortalidad, se compararon otros aspectos como la duración de la cirugía, encontrándose que la hipotermia reduce el tiempo debido a una anestesia más estable del animal [18(16.0-24.2) vs. 10 (8.75 – 11.5); $p = 0.0001$].



Gráfica 1. Comparación de anestésicos para la cirugía por hipoxia-isquemia cerebral perinatal

Una vez seleccionado el anestésico, se estandarizó el tamaño de camada más adecuado, ya que el tratamiento se administró semanalmente dependiendo del peso de los animales, además se ha observado que el estado de nutrición es importante para asegurar la sobrevivencia de las ratas, en total se compararon 14 camadas y los pesos a los 7 días posnatales de 119 ratas,

encontrándose los grupos más homogéneos en un tamaño de camada de 7 a 10 animales en un rango de peso de 12 a 15 gr (Tabla 10).

Tabla 9. Estandarización del tamaño de camada

Tamaño de la camada	Grupos homogéneos con base en el peso a los 7 días post natales								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	9.33								
13	9.93								
11	10.26								
10	10.42	10.42							
13	10.75	10.75	10.75						
10		11.88	11.88	11.88					
9		11.91	11.91	11.91					
8			12.25	12.25	12.25				
9				12.89	12.89	12.89			
8					13.60	13.60	13.60		
8						14.09	14.09		
7							15.11	15.11	
5								16.26	
5									20.22

Para determinar las características óptimas de la hipoxia se utilizaron 6 ratas de 7 días posnatales las cuales se dividieron en 2 grupos, la hipoxia se probó a un flujo de 3 L/min durante 60 min y a 5 L/min durante 90 min. Se midieron las áreas de lesión de los cortes coronales del cerebro (anterior, medio y posterior) teñidos con cloruro de tetrazolio (TTC), en la Figura 20 se puede observar una coloración rosada en el tejido sano mientras que la zona lesionada se ve blanca.



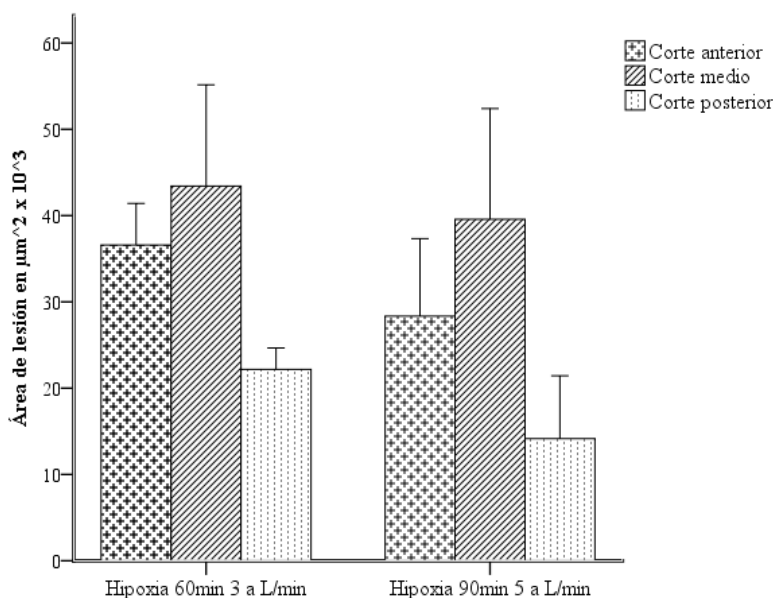
Hipoxia 60 min a 3 L/min



Hipoxia 90 min a 5 L/min

Figura 20. Lesión por hipoxia isquemia en cerebros de rata de 8 días posnatales en los que se compararon dos tiempos y flujos de gas para el modelo de hipoxia. Tinción con cloruro de tetrazolio.

Las áreas de lesión en los cortes cerebrales con hipoxia de 3 L/min durante 60 min fueron de $36.6 \pm 8.4 \mu\text{m}^2$ en la zona anterior del cerebro, $43.4 \pm 20.3 \mu\text{m}^2$ zona media del cerebro y $22.2 \pm 4.3 \mu\text{m}^2$ en zona posterior del cerebro; mientras que las ratas sometidas a una atmósfera hipóxica a un flujo de 5 L/min durante 90 min tuvieron una media de lesión de $28.3 \pm 15.5 \mu\text{m}^2$ en el corte 1, $39.6 \pm 22.2 \mu\text{m}^2$ en el corte 2 y $14.1 \pm 12.6 \mu\text{m}^2$ en el corte 3 con una p de 0.275, 0.827 y 0.513 respectivamente (Gráfica 2), no existiendo diferencias significativas.



Gráfica 2. Comparación de los tiempos y flujos de gas para el modelo de hipoxia

Resultados de la evaluación de la función motora

Evaluación del ángulo de las extremidades posteriores

La evaluación del ángulo de las extremidades posteriores se realizó en 3 días consecutivos posteriores a la lesión hipóxica-isquémica, para ello se utilizaron 35 ratas wistar de ambos sexos los días postnatales 8, 9 y 10. El primer día de evaluación (día postnatal 8 o 24 h postcirugía) todas las ratas sham llevaron a cabo la prueba satisfactoriamente, mientras que 2 ratas (15.4 %) del grupo de SS y 5 ratas (35.7 %) del grupo de AL no fueron incluidas en el análisis debido a que no caminaron. Los días postnatales 9 y 10, es decir a las 48 y 72 horas de haber realizado la lesión, todas las ratas de los grupos sham y AL fueron capaces de realizar la

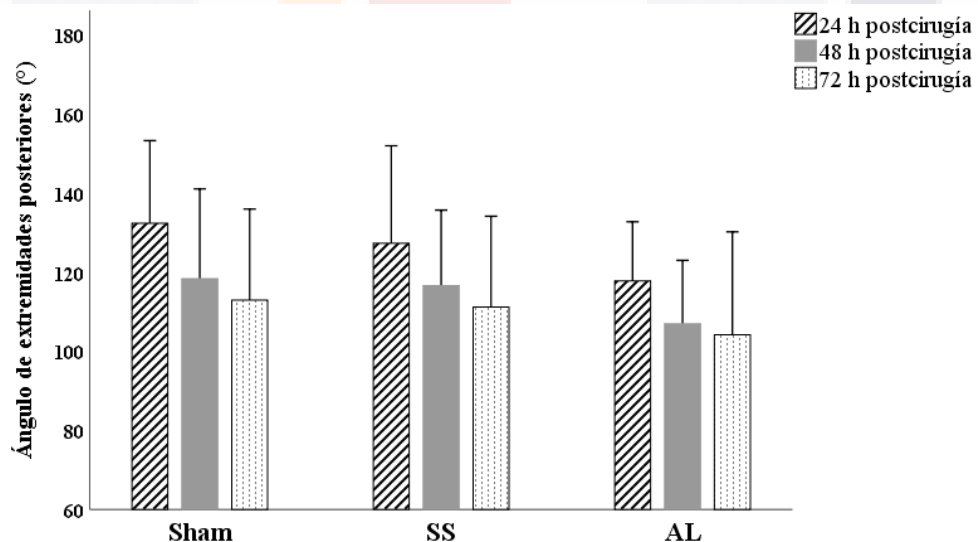
prueba y sólo 1 rata (7.7 %) del grupo de SS no fue incluida en el día posnatal 10 ya que no caminó.

Respecto a la evaluación se pudo observar que los ángulos de las extremidades posteriores fueron disminuyendo conforme pasó el tiempo; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los ángulos de las extremidades posteriores de las ratas lesionadas en comparación con el grupo sham, en la Tabla 12 y la Gráfica 3 se pueden observar los valores promedio de los ángulos posteriores de las ratas evaluadas.

Tabla 10. Comparación del ángulo de extremidades posteriores entre los grupos sham, SS y AL a las 24, 48 y 72 horas postcirugía

Ángulo de extremidades posteriores	Sham (n=8)	SS (n=13)	AL (n=13)	P
24 h postcirugía	132.4 ± 20.9	127.4 ± 24.7	117.8 ± 15.0	0.354
48 h postcirugía	118.4 ± 22.7	117.6 ± 17.6	111.0 ± 16.0	0.547
72 h postcirugía	112.3 ± 23.0	107.4 ± 25.6	111.5 ± 23.8	0.862

Los datos están representados con medias ± desviación estándar. Se realizaron comparaciones múltiples utilizando la prueba ANOVA considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.



Gráfica 3. Comparación del ángulo de extremidades posteriores entre los grupos sham, SS y AL a las 24, 48 y 72 horas postcirugía

Evaluación del reflejo de enderezamiento

Para la evaluación del reflejo de enderezamiento se utilizaron 35 ratas wistar de ambos sexos (sham n=8, SS n=13 y AL n=14) los días posnatales 8, 9 y 10, es decir a las 24, 48 y 72 horas postcirugía.

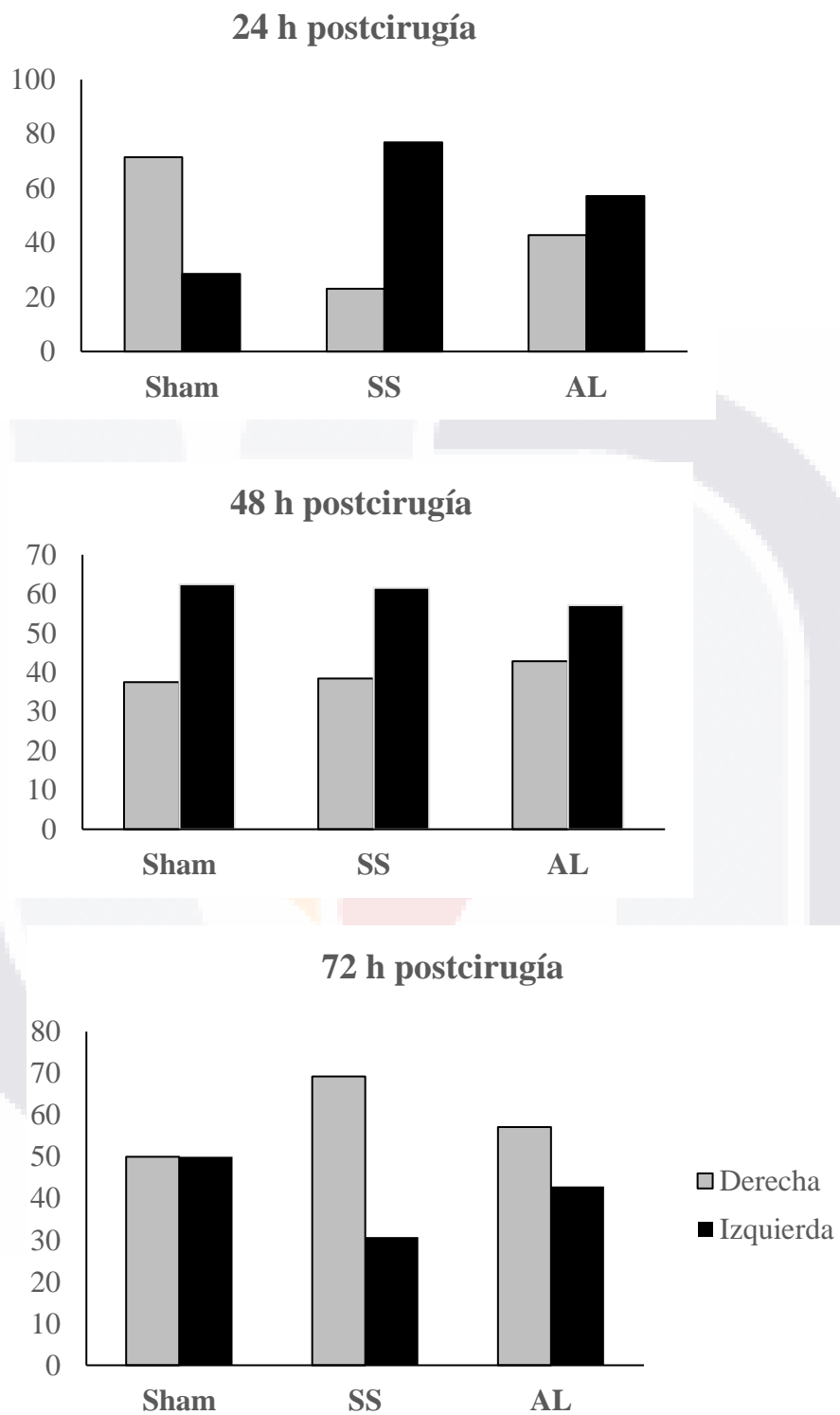
Al comparar las ratas sham con las lesionadas no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que tardaron en enderezarse a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la lesión, los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11. Comparación del tiempo de enderezamiento (s) en ratas sham y con lesión hipóxica isquémica del grupo SS y AL a las 24, 48 y 72 horas posterior a la cirugía

Tiempo de enderezamiento		Sham (n=8)	SS (n=13)	AL (n=14)	P
24 h postcirugía	1ª evaluación	3.6 (3.2, 4.3)	2.9 (2.0, 3.7)	3.2 (2.5, 4.2)	0.326
	2ª evaluación	2.9 (2.4, 3.1)	2.6 (2.0, 3.5)	2.6 (2.0, 3.8)	0.732
	3ª evaluación	2.5 (2.1,3.3)	3.3 (2.9, 3.7)	2.5 (2.1, 3.4)	0.113
	Promedio a las 24 h	3.0 (2.6, 3.2)	3.1 (2.7, 3.6)	3.0 (2.4, 3.7)	0.213
48 h postcirugía	1ª evaluación	1.9 (1.4, 2.2)	1.9 (1.5, 2.6)	1.9 (1.6, 2.4)	0.910
	2ª evaluación	2.2 (1.7, 3.4)	1.8 (1.6, 4.5)	2.0 (1.6, 2.3)	0.829
	3ª evaluación	2.0 (1.9, 2.4)	2.1(1.7, 2.9)	2.1 (1.6, 2.5)	0.844
	Promedio a las 48 h	1.9 (1.7, 2.5)	2.1 (1.8, 3.2)	2.0 (1.7, 2.6)	0.801
72 h postcirugía	1ª evaluación	2.1 (1.4, 2.4)	2.1 (1.8, 2.6)	1.9 (1.4, 2.5)	0.716
	2ª evaluación	2.2 (1.6, 2.4)	2.3 (1.5, 3.1)	1.7 (1.1, 3.2)	0.513
	3ª evaluación	1.8 (1.5, 2.5)	2.1 (1.6, 3.5)	2.1 (1.7, 3.4)	0.592
	Promedio a las 72 h	2.0 (1.8, 2.3)	2.3 (1.7, 3.2)	2.0 (1.6, 3.2)	0.703

Los datos se representan como medianas y rangos intercuartílicos (25% - 75 %). Se realizó la prueba U de Mann-Whitney considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Adicionalmente se verificó la preferencia en la dirección del giro al incorporarse, encontrándose que a las 24 h postcirugía las ratas lesionadas prefirieron realizar el giro hacia la izquierda (SS 76.9% y AL 57.1%) en comparación con las ratas sham que en su mayoría giraron a la derecha (71.4%), como se puede observar en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Predilección de giro para el reflejo de enderezamiento en los días postnatales 8, 9 y 10 (a las 24, 48 y 72 h postcirugía) de los grupos sham, SS y AL. Los valores están representados como porcentajes.

La preferencia por la dirección de giro a la izquierda en las ratas lesionadas se mantuvo a las 48 h postcirugía con un porcentaje del 61.5 % en el grupo de SS y del 57.1% en el grupo de AL. Finalmente, el 3er día de evaluación dirección de giro en las ratas sham fue indistinto pues el 50% giró a la derecha y el 50% giró a la izquierda, mientras que los grupos lesionados hubo una mayor predilección por girar a la derecha a las 72 h postcirugía (69.2% en el grupo de SS y 57.1% en el grupo de AL).

Prueba de campo abierto

Para la prueba de campo abierto se hicieron 2 evaluaciones, la primera prueba se llevó a cabo en la 3ª semana de tratamiento y la segunda prueba se llevó a cabo en la 4ª semana de tratamiento. En total se incluyeron 33 ratas de las cuales 11 fueron del grupo sham, 10 de SS y 12 de AL.

En la primera evaluación del campo abierto (en la 3ª semana de tratamiento) no se observaron diferencias significativas entre los grupos sham y los grupos lesionados con y sin tratamiento, los resultados de las evaluaciones de la actividad, velocidad, distancia, tiempo, número de entradas y las veces que se irguieron en dos patas (*rearings*), tanto en la zona periférica (ZP) de la caja como en la zona central (ZC) fueron similares, estos resultados se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 12. Comparación de la evaluación de la prueba de campo abierto en ratas sham y con HICP del grupo SS y AL en la tercera semana de tratamiento.

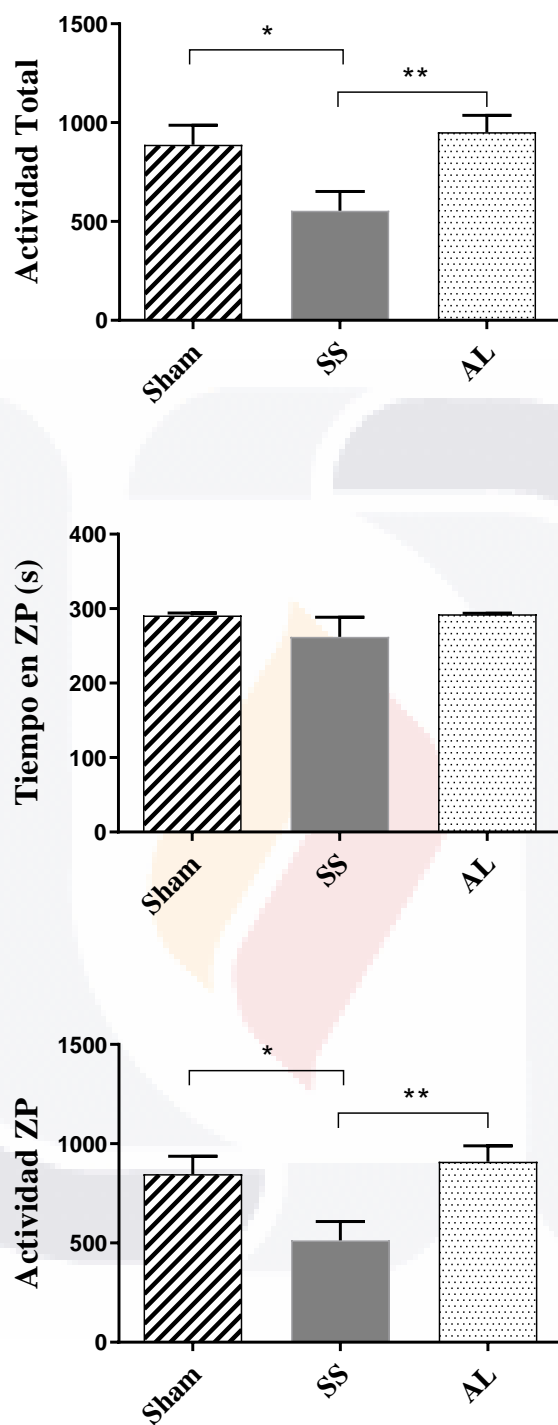
Evaluación de la prueba de campo abierto	Sham (n=11)	SS (n=10)	AL (n=12)	p
Actividad ZP	888.4 ± 191.6	788.5 ± 359.8	923.8 ± 290.9	0.535
Actividad ZC	49.5 ± 60.7	72.3 ± 65.6	48.4 ± 45.9	0.566
Actividad Total	937.8 ± 179.1	860.8 ± 391.6	972.2 ± 323.3	0.696
Velocidad ZP (cm/s)	4.0 ± 0.8	4.0 ± 2.1	4.6 ± 1.8	0.569
Velocidad ZC (cm/s)	11.9 ± 4.9	11.0 ± 7.6	16.5 ± 8.8	0.188
Velocidad Total (cm/s)	4.2 ± 0.8	4.2 ± 4.9	4.9 ± 1.9	0.614

Tabla 12. Comparación de la evaluación de la prueba de campo abierto en ratas sham, y con HICP de los grupos SS y AL en la tercera semana de tratamiento (*Continuación*)

Evaluación de la prueba de campo abierto	Sham (n=11)	SS (n=10)	AL (n=12)	p
Distancia ZP (cm)	1159.5 ± 234.3	1143.4 ± 596.9	1348.5 ± 486.4	0.504
Distancia ZC (cm)	98.7 ± 80.7	152.6 ± 152.8	118.7 ± 103.2	0.560
Distancia total (cm)	1258.1 ± 215.3	1296.0 ± 696.4	1467.1 ± 570.8	0.606
Tiempo ZP (s)	290.2 ± 10.5	282.7 ± 12.6	292.2 ± 8.1	0.102
Tiempo ZC (s)	9.9 ± 10.6	17.3 ± 12.7	7.9 ± 8.0	0.112
Entradas ZP (n)	5.5 ± 3.3	10.1 ± 9.5	7.6 ± 7.0	0.341
Entradas ZC (n)	4.6 ± 3.2	9.5 ± 9.8	7.3 ± 6.8	0.295
Entradas totales (n)	10.2 ± 6.5	19.6 ± 19.3	14.8 ± 13.8	0.319
Rearings ZP (n)	34.8 ± 14.7	27.0 ± 15.9	34.6 ± 16.0	0.436
Rearings ZC (n)	2.1 ± 4.2	1.4 ± 1.5	1.7 ± 2.3	0.859
Rearings totales (n)	36.1 ± 15.8	27.9 ± 15.9	34.9 ± 16.2	0.460

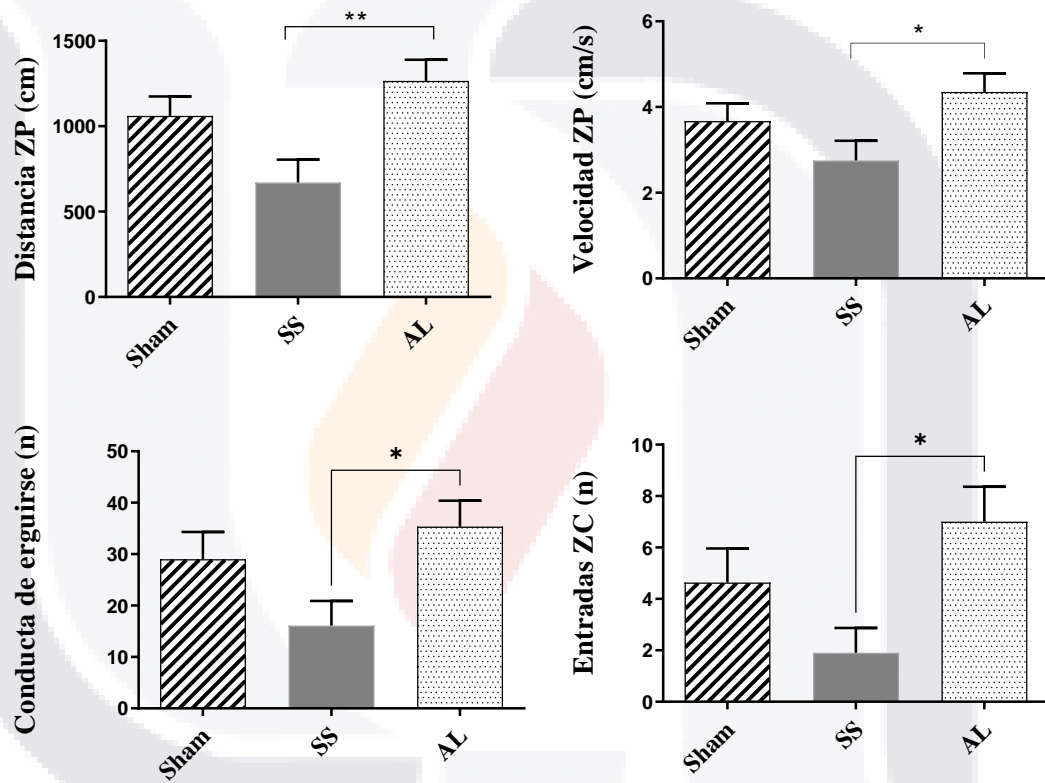
ZP: zona periférica, ZC: zona central, Rearings: erguirse en 2 patas. Se hicieron comparaciones múltiples mediante la prueba de Anova y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Por otro lado, en la 4ª semana de tratamiento se observaron diferencias significativas en la actividad total de las ratas entre los grupos sham vs SS [888.5 ± 327.6, vs 554.7 ± 305.7, (p=0.013)] y los grupos SS vs AL [554.7 ± 305.7, vs 951.9 ± 296.2, (p=0.013)], también se observó que la actividad en la ZP fue mucho mayor en los grupos sham y AL en comparación con el grupo SS [846.8 ± 297.0; 909.2 ± 275.8, vs 512.8 ± 302.8, (p=0.008)] a pesar de que no hubo diferencias significativas en el tiempo que pasaron todos los grupos en la ZP (Gráfica 5), pudiendo observarse que las ratas del grupo de SS permanecieron más tiempo estáticas y en las esquinas de la caja en comparación con los otros dos grupos, situación que pudiera evidenciar mayor ansiedad en este grupo al realizar la prueba.



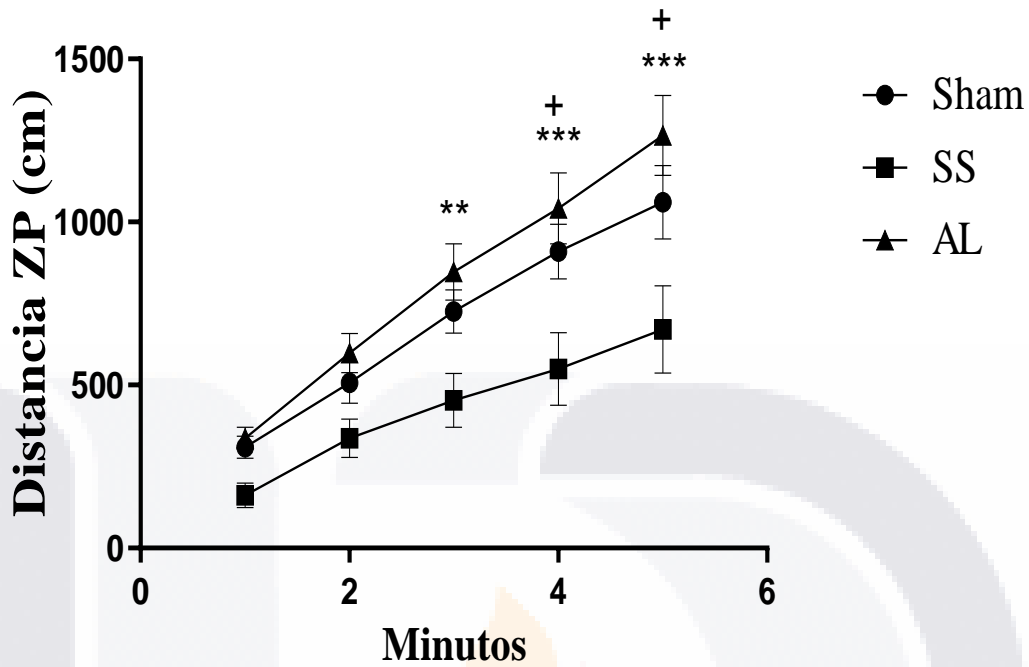
Gráfica 5. Comparación de la diferencia en la actividad total, tiempo en la zona periférica y actividad en la zona periférica en la 4ª semana de tratamiento.

Como consecuencia de la menor actividad en la ZP en la 4ª semana de tratamiento, las ratas del grupo SS tuvieron un desempeño significativamente menor en comparación con el grupo AL en la distancia recorrida [670.9 ± 423.9 vs 1266.1 ± 427.1 , ($p=0.007$)], la velocidad promedio en la ZP [2.8 ± 1.5 vs 4.6 ± 1.6 , ($p=0.05$)] y la actividad exploratoria al presentar una baja frecuencia de *rearings* (conducta de erguirse en dos patas) [16.1 ± 15.2 vs 35.3 ± 17.5 , ($p=0.04$)] y también una baja frecuencia de entradas a la ZC de la caja [1.9 ± 3.1 vs 7.0 ± 4.7 , ($p=0.027$)], estos resultados se pueden observar en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Comparación de la distancia, la velocidad y la frecuencia de *rearings* o conducta de erguirse en dos patas en la zona periférica y la frecuencia de entradas que tuvieron los animales a la zona central en la 4ª semana de tratamiento.

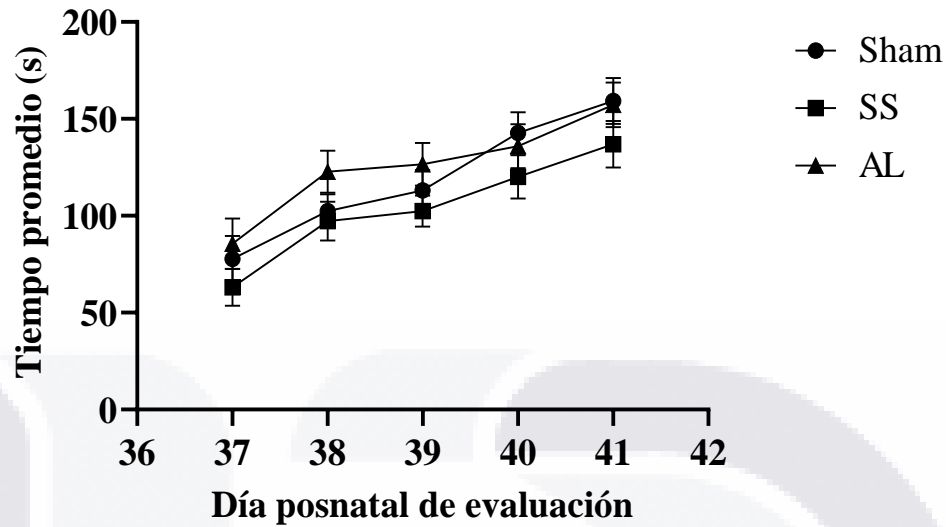
Adicionalmente, en la 4ª semana de tratamiento se observó que la distancia recorrida en la ZP fue significativamente mayor en los grupos sham y AL en comparación con el grupo SS a partir del minuto 3 de iniciada la prueba, es decir que inicialmente todos los grupos tenían la misma actividad; sin embargo, pasados 3 minutos de la prueba las ratas de los grupos sham y AL empezaron a explorar más y por lo tanto recorrieron mayor distancia, estos resultados se pueden observar en la Gráfica 7.



Gráfica 7. Comparación de la distancia recorrida por minuto en la zona periférica del campo abierto durante la 4ª semana de tratamiento.

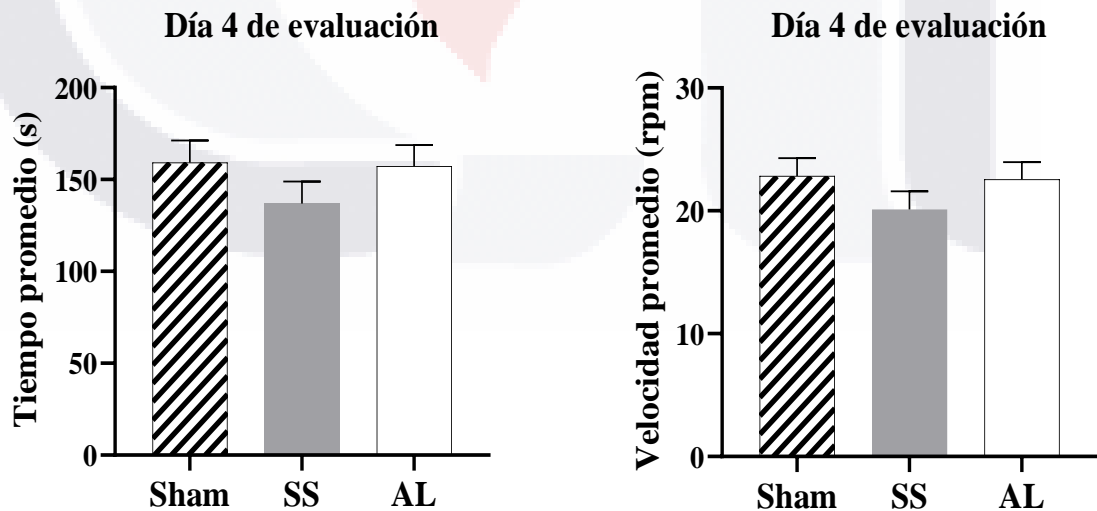
Resultados de la prueba de rota rod

La evaluación de la coordinación sensoriomotora a través de la prueba de rota rod no mostró diferencias significativas en el tiempo de permanencia sobre el rodillo o la velocidad máxima que alcanzó cada animal para los grupos sham, SS y AL por día de evaluación; sin embargo se pudo demostrar que todos los animales fueron aprendiendo cómo realizar la prueba conforme pasó el tiempo debido a que fueron incrementando el tiempo de permanencia sobre el rodillo y alcanzaron velocidades más altas conforme fueron pasando los días de entrenamiento, estos resultados se pueden observar en la Gráfica 8.



Gráfica 8. Comparación del tiempo de permanencia durante la prueba de Rota rod

En la Gráfica 9 se puede observar que el día final de evaluación “Día de la prueba” tampoco hubo diferencias significativas en el tiempo [sham 159.3 ± 77.3 s, SS 136.9 ± 72.4 s, AL 157.2 ± 77.0 s, ($p=0.366$)] o la velocidad máxima alcanzada [sham 22.8 ± 9.5 rpm, SS 20.1 ± 8.9 rpm, AL 22.6 ± 9.4 rpm, ($p=0.372$)].



Gráfica 9. Comparación del tiempo y velocidad en la prueba de rota rod el día de evaluación (día 4)

Resultados de la evaluación de la función cognitiva

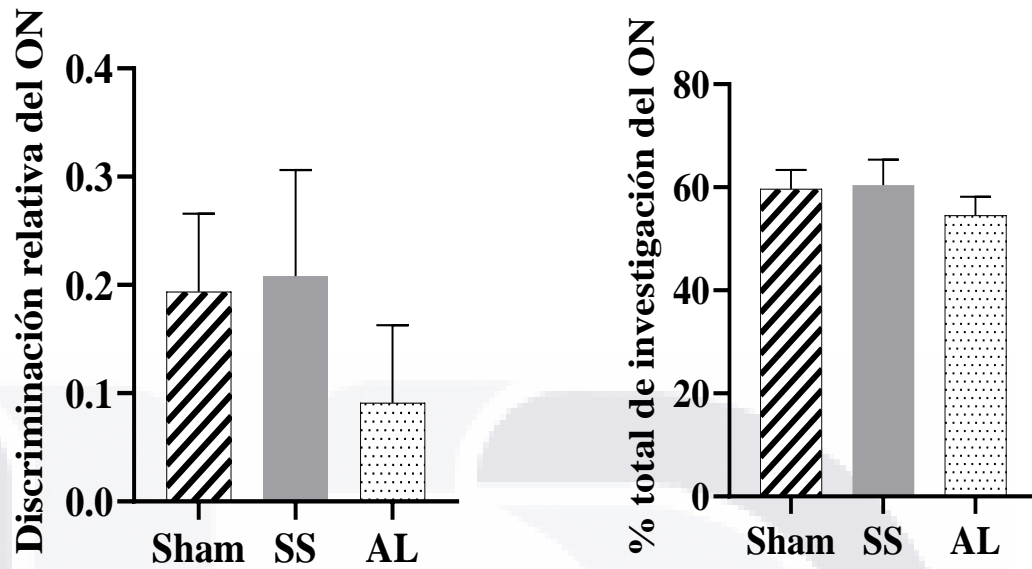
Resultados de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso

El análisis evaluó la diferencia entre los grupos sham, SS y AL, sobre las variables “discriminación relativa del objeto novedoso”, y “porcentaje total de investigación del objeto novedoso”. Se observó que los animales del grupo sham tuvieron una discriminación relativa y % total de investigación del objeto novedoso (ON) similar a la de los grupos lesionados ($p=0.544$), los valores promedio de la discriminación relativa fueron positivos en los tres grupos lo que indica que los animales exploraron por más tiempo el objeto novedoso el día de la prueba, esto mismo se observó en la variable % total de investigación, ya que en todos los grupos se obtuvo un porcentaje por arriba del 50% lo que indica que pasaron más de la mitad del tiempo de exploración con el objeto novedoso, estos resultados indican que la memoria declarativa a largo plazo se mantuvo a pesar de la lesión (ver Tabla 14 y Gráfica 10).

Tabla 13. Datos descriptivos de las variables discriminación relativa y % total de investigación del objeto novedoso de los grupos sham, SS y AL.

Variables de estudio	Sham (n=16)	SS (n=17)	AL (n=17)	P
Discriminación relativa				
Media \pm DE	0.194 \pm 0.288	0.208 \pm 0.404	0.091 \pm 0.295	0.544
Mediana	0.225	0.270	0.120	
[Min, Max]	[-0.24, 0.77]	[-0.74, 0.90]	[-0.67, 0.53]	
Porcentaje total de investigación del objeto novedoso				
Media \pm DE	59.7 \pm 14.4	60.4 \pm 20.2	54.6 \pm 14.7	0.544
Mediana	61.2	63.6	55.8	
[Min, Max]	[38.1, 88.7]	[13.1, 95.2]	[16.5, 76.6]	

Tanto la discriminación relativa como el porcentaje total de investigación del objeto novedoso mostraron una distribución normal por Shapiro-Wilk, con homogeneidad de las varianzas evaluada con Levene con $F=0.616$. Las diferencias de medias se evaluaron con ANOVA de una vía considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

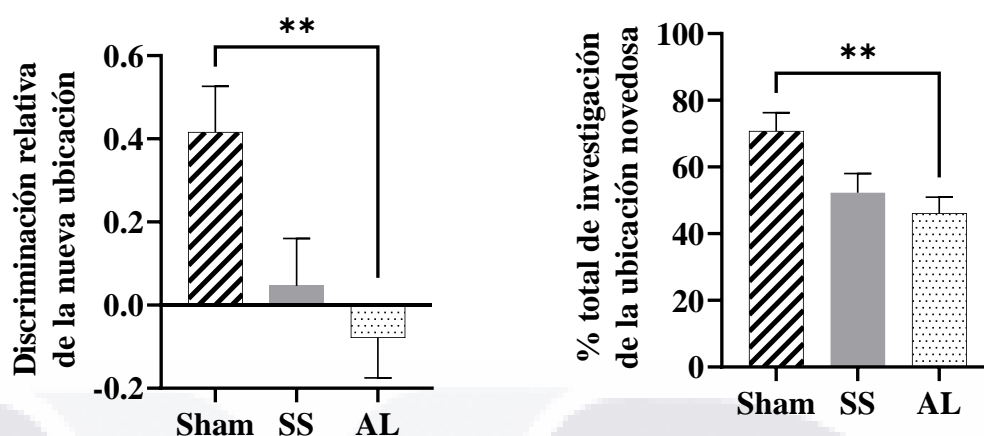


Gráfica 10. Discriminación relativa y porcentaje total de investigación del objeto novedoso en ratas sham y ratas con lesión hipóxico-isquémica de los grupos SS y AL.

Resultados de la prueba de reconocimiento de lugar

Debido a que no se observaron diferencias significativas en la evaluación de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, se decidió utilizar una submuestra para realizar la prueba de reconocimiento de lugar, esta prueba permite evaluar la memoria espacial asociada al daño en hipocampo y la corteza entorrinal, ambas áreas afectadas por lesiones hipóxico-isquémicas (Denninger et al., 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que las ratas sham tuvieron un mejor desempeño en comparación con los animales lesionados tanto en la variable “*discriminación relativa de la nueva ubicación*”, como en la variable del “*porcentaje total de investigación de la ubicación novedosa*”, evidenciando que la lesión hipóxico-isquémica afectó la memoria espacial de los animales lesionados; estas alteraciones fueron significativamente mayores en los animales que fueron tratados con AL ver Gráfica 11.



Gráfica 11. Discriminación relativa y porcentaje total de investigación del objeto en la nueva ubicación en ratas sham y ratas con lesión hipóxico-isquémica de los grupos SS y AL. Se realizaron comparaciones de las medias con la prueba ANOVA de una vía considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

En la Tabla 15 se puede observar que los animales tratados con AL tuvieron una discriminación relativa negativa, lo que indica que los animales pasaron menos tiempo explorando el objeto en la ubicación novedosa, estos resultados coincidieron con el porcentaje total de investigación, el cual refleja que del 100% del tiempo que dedicaron a la exploración de ambos objetos sólo pasaron 46.1% de ese tiempo explorando el objeto en la nueva ubicación.

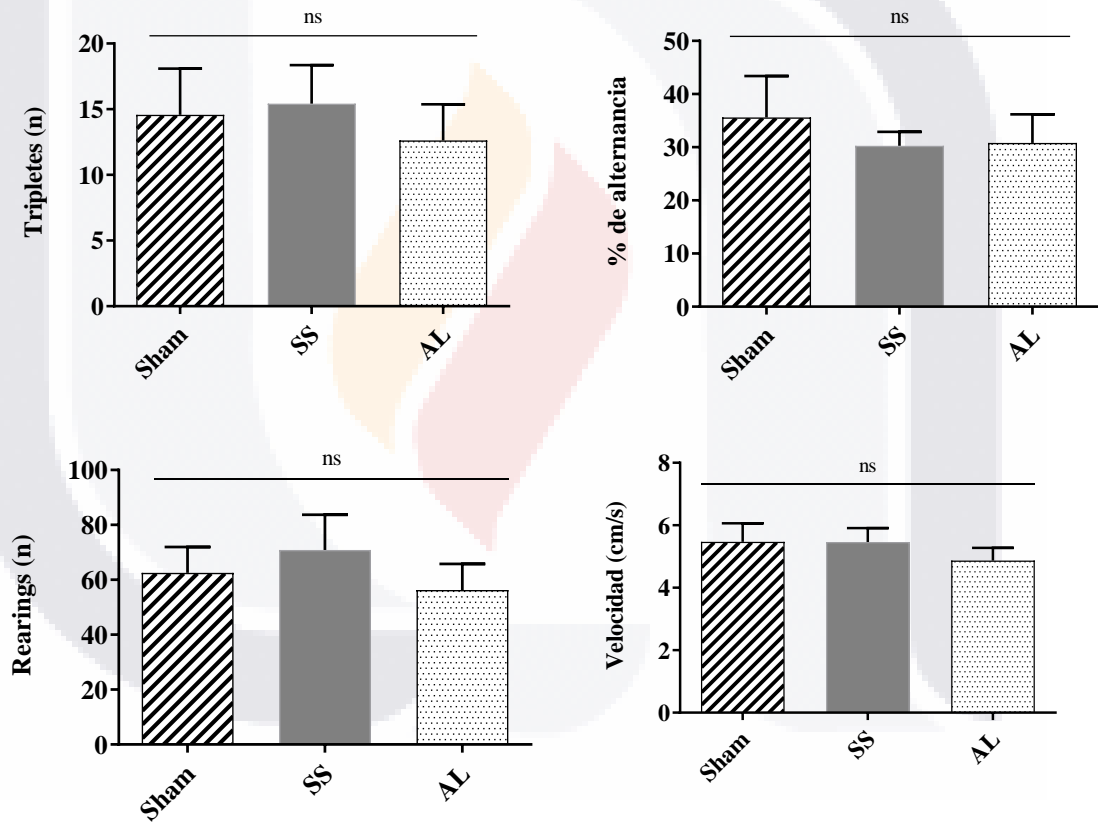
Tabla 14. Datos descriptivos de las variables discriminación relativa y % total de investigación del objeto en la ubicación novedosa para los grupos sham, SS y AL

VARIABLES DE ESTUDIO	Sham (n=8)	SS (n=5)	AL (n=8)	P
Discriminación relativa				
Media ± DE	0.416 ± 0.312	0.046 ± .256	-0.078 ± 0.273	0.008
Mediana	0.447	.009	-0.156	
[Min, Max]	[-0.22, 0.88]	[-0.27, 0.43]	[-0.36, 0.30]	
Porcentaje total de investigación del objeto novedoso				
Media ± DE	70.8 ± 15.6	52.3 ± 12.8	46.1 ± 13.7	0.008
Mediana	72.35	50.5	42.2	
[Min, Max]	[38.8, 94.1]	[36.6, 71.4]	[32.0, 65.2]	

Tanto la discriminación relativa como el porcentaje total de investigación de la ubicación novedosa mostraron una distribución normal por Shapiro-Wilk, con homogeneidad de las varianzas evaluada con Levene con $F=6.366$. Las diferencias de medias se evaluaron con ANOVA de una vía considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados del laberinto en Y

Para la prueba del laberinto en Y se evaluó la diferencia entre los grupos sham, SS y AL sobre la variable tripletes, que refleja la memoria espacial a corto plazo mediante la alternancia espontánea; adicionalmente se comparó el % de alternancia, la actividad exploratoria mediante el número de veces que la rata se erguía en dos patas o *rearings*, y la velocidad promedio a la que se desplazaron las ratas durante la prueba, no encontrándose diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas (ver Gráfica 12). Los datos descriptivos de estas variables se pueden observar en la Tabla 16.



Gráfica 12. Comparación del número de tripletes, el % de alternancia, número de *rearings* y velocidad promedio durante la evaluación de la prueba del laberinto en Y para los grupos sham, SS y AL

Tabla 15. Comparación de la evaluación de la prueba laberinto en Y para los grupos sham, SS y AL

Variabes de estudio	Sham (n=8)	SS (n=5)	AL (n=8)	P
Tripletes(n)	14.6 ± 9.3	15.4 ± 7.7	12.6 ± 7.8	0.798
% de alternancia	35.6 ± 20.6	30.3 ± 6.8	30.8 ± 15.2	0.772
<i>Rearings</i> (n)	62.6 ± 24.9	70.86 ± 33.9	56.3 ± 26.9	0.624
Velocidad (cm/s)	5.5 ± 1.6	5.5 ± 1.2	4.9 ± 1.2	0.595
Distancia (cm)	3281.3 ± 936.9	3276.2 ± 712.1	2920.0 ± 691.8	0.595

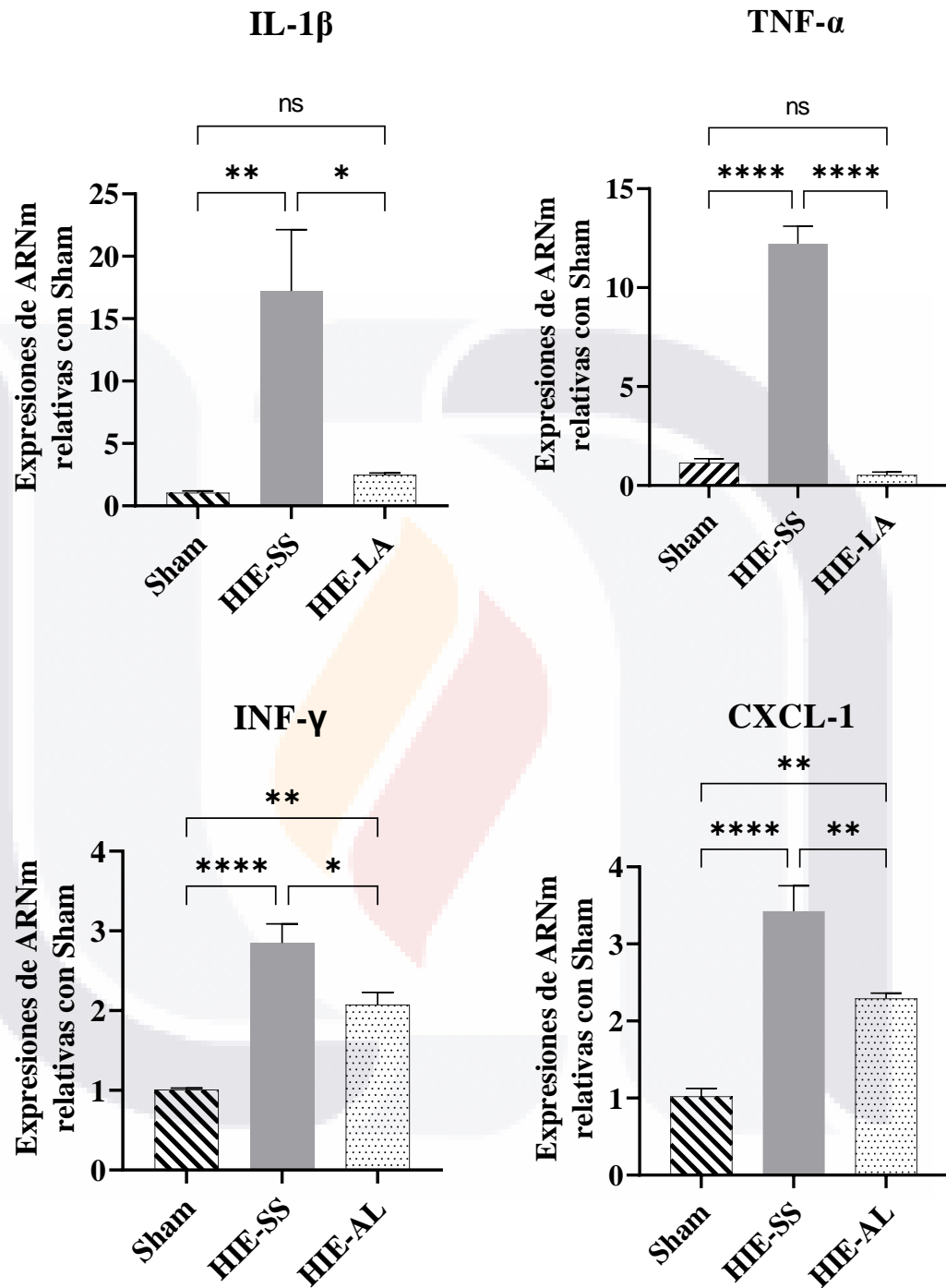
Las variables analizadas mostraron homogeneidad de las varianzas evaluada con Levene $F= 0.228, 0.772, 0.483, 0.534, 0.534$, respectivamente. Las diferencias de medias fueron evaluadas con ANOVA de una vía considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados de la evaluación molecular

Evaluación de la respuesta inflamatoria por qPCR

Debido a que la inflamación es uno de los principales mecanismos de daño después de un evento HI (Hagberg et al., 2015; Kaur et al., 2013), se evaluó el efecto del AL en el daño inflamatorio. Para ello, se analizó la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α mediante qPCR en tiempo real a las 72 horas posteriores a la lesión.

En comparación con el grupo sham, las ratas con HI tratadas con SS tuvieron una expresión al alza de las citocinas proinflamatorias IL-1 β (1.05 ± 0.28 vs 17.22 ± 9.83 , $p < 0.01$) y TNF- α (1.15 ± 0.41 vs 12.21 ± 1.79 , $p < 0.0001$), IFN- γ (1.01 ± 0.04 vs 2.85 ± 0.48 , $p < 0.0001$) y la quimiocina CXCL-1 (1.02 ± 0.21 vs 3.42 ± 0.66 , $p < 0.0001$) mientras que el tratamiento con AL previno o redujo la regulación a la alza de los genes relacionados con la inflamación aguda. El grupo de HI tratado con AL tuvieron una expresión similar tanto de IL-1 β (1.05 ± 0.28 vs 2.50 ± 0.25 , $p= 0.9313$) como de TNF- α (1.15 ± 0.41 vs 0.54 ± 0.30 , $p= 0.7066$) con el grupo sham. Además, los animales con HI tratados con AL mostraron atenuación en la expresión de IL-1 β (2.50 ± 0.25 vs 17.22 ± 9.83 , $p = 0.0130$), TNF- α (0.54 ± 0.30 vs 12.21 ± 1.79 , $p < 0.0001$), INF- γ (2.07 ± 0.31 vs 2.85 ± 0.48 , $p= 0.0226$) y CXCL-1 (2.29 ± 0.14 vs 3.42 ± 0.66 , $p= 0.0089$) en comparación con el grupo no tratado. Estos datos sugieren que el tratamiento con AL parcialmente reduce la neuroinflamación inducida por HI en ratas neonatas (ver Gráfica 13).



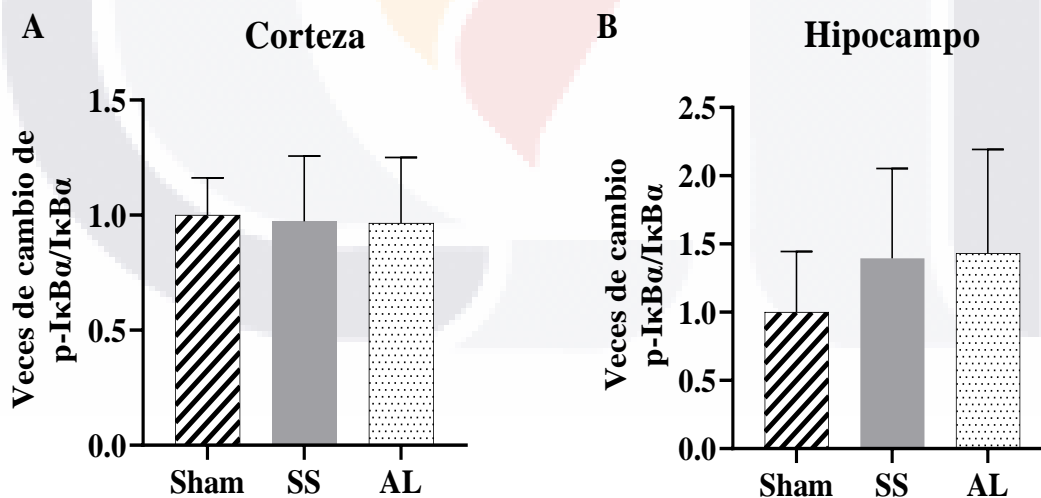
Gráfica 13. Expresión de mRNA por RT-qPCR de IL-1 β , TNF- α , INF- γ y CXCL-1 en ratas sham y con lesión HI tratadas con SS y AL, 72 horas posterior a la lesión. Se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de ANOVA de una vía. Los datos están representados con medias \pm error estándar. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.001, ns= no significancia.

Evaluación de la respuesta inflamatoria por western blot

El NF-κB es un factor nuclear que potencia los estados de inflamación, por lo tanto, un incremento en la fosforilación del inhibidor IκBα (p- IκBα) es un indicativo de la traslocación de NF-κB al núcleo y el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (Kielland et al., 2012).

Debido a lo antes mencionado se analizó la expresión proteica de los inhibidores IκBα (estado inactivo de NF-κB) y p-IκBα (estado activo de NF-κB) y la relación de ambos p-IκBα/IκBα en el modelo de HI.

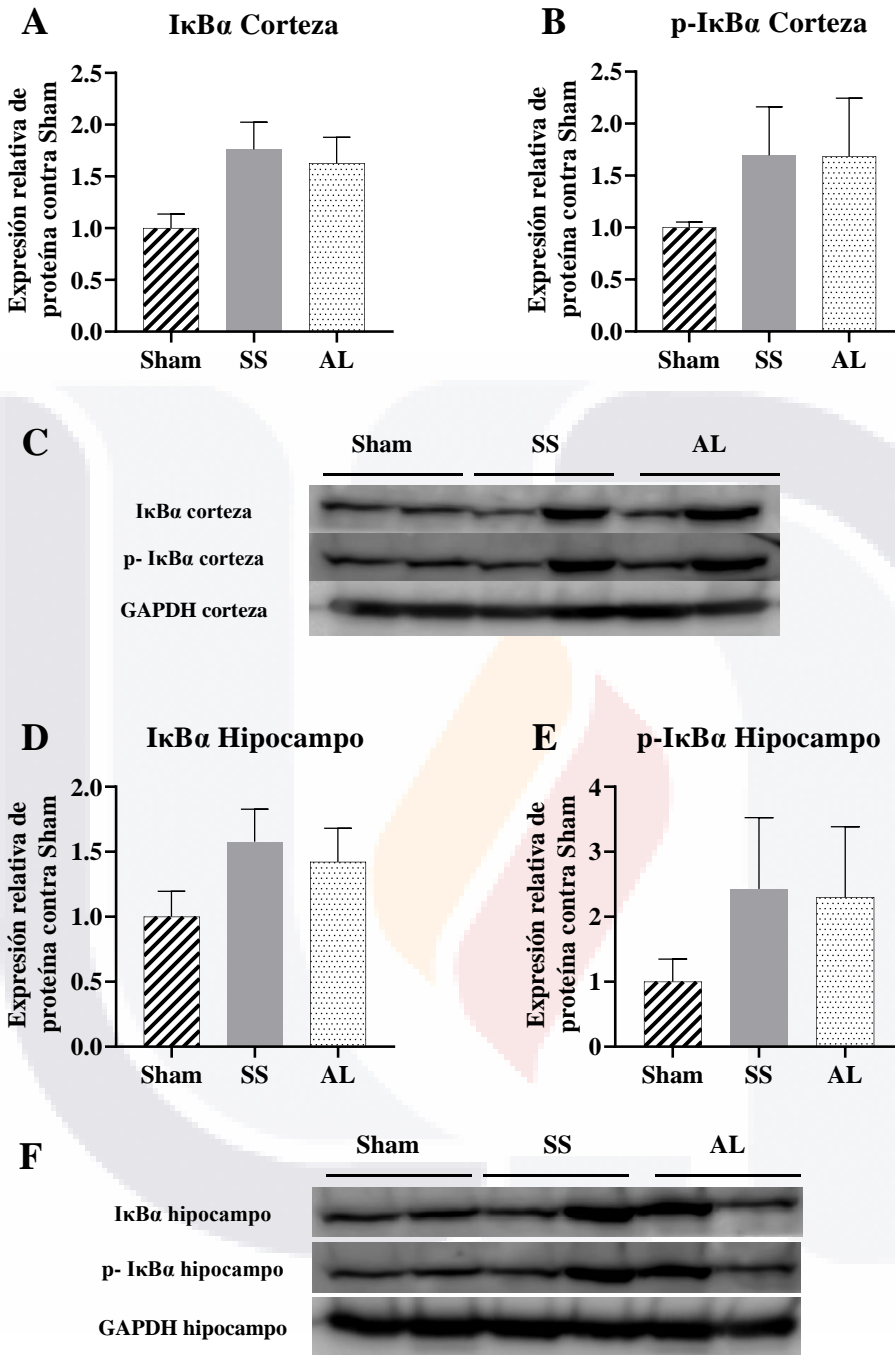
Se analizó la relación de p-IκBα/IκBα tanto en corteza como en hipocampo, encontrándose que la proporción entre la expresión de ambos inhibidores fue muy similar en corteza, mientras que la proporción encontrada de p-IκBα/IκBα en hipocampo mostró una tendencia mayor en los grupos con HI, estos resultados indican que hubo una mayor activación de NF-κB en hipocampo y por ende mayor inflamación, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Gráfica 14).



Gráfica 14. Veces de cambio con respecto a sham de la relación p-IκBα/IκBα A) corteza y B) hipocampo de ratas de los grupos sham, SS y AL a las 72 h de la lesión HI (n=4). Los datos están representados con medias ± error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de p < 0.05 como estadísticamente significativo.

Adicionalmente se observó que en comparación con el grupo sham, tanto SS como AL tuvieron un incremento casi del doble en la expresión de p-I κ B α en la corteza e hipocampo del lado lesionado; lo cual indica la activación de NF- κ B para su traslocación al núcleo e inducir mayor inflamación. De igual forma la expresión de I κ B α se encontraba aumentada en los grupos con HI en comparación con el grupo sham, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, los resultados se pueden observar en la Gráfica 15 que aparece en la siguiente página.



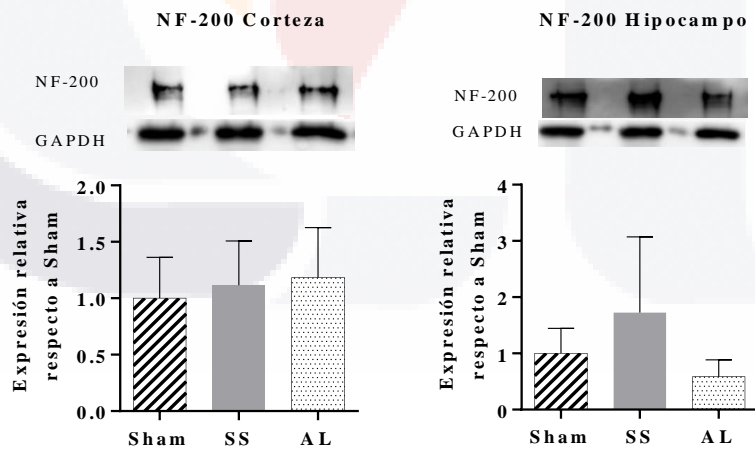


Gráfica 15. Inmunotransferencias representativas de IκBα y p-IκBα en cortezas e hipocampos de ratas de los grupos sham, SS y AL a las 72 h de la lesión HI (n=4). GAPDH se utilizó como control interno de carga. A-B. Cuantificación de IκBα y p-IκBα en cortezas ipsilaterales a la lesión. C. Western blots representativos de las proteínas evaluadas en corteza. D y E. Cuantificación de IκBα y p-IκBα en hipocampos ipsilaterales a la lesión. F. Western blots representativos de las proteínas evaluadas en hipocampo. Las expresiones se normalizaron con el grupo sham. Los datos están representados con medias ± error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Evaluación de proteínas estructurales por western blot

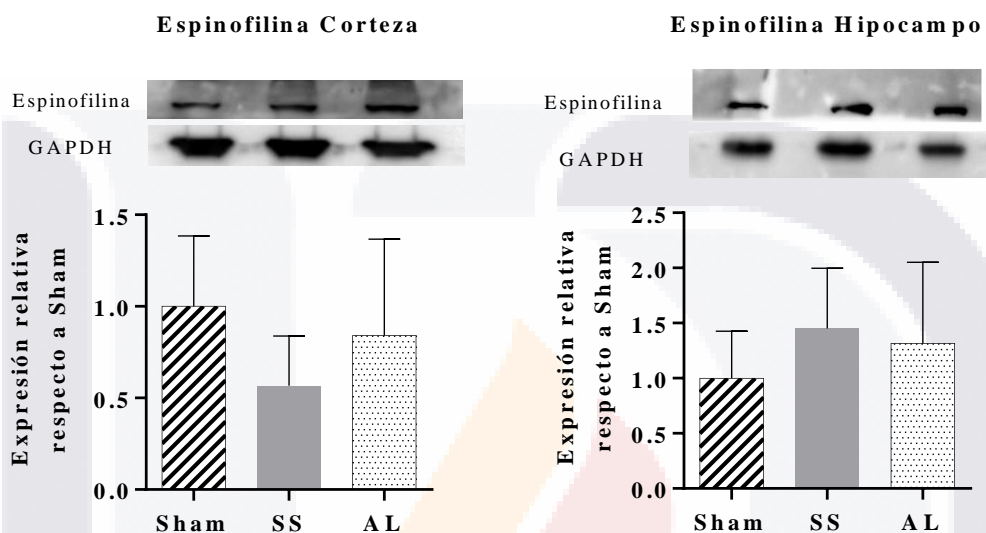
Se evaluaron 4 diferentes proteínas estructurales tanto en la corteza como en el hipocampo del hemisferio derecho (lado lesionado): la primera de ellas fue la subunidad de neurofilamentos intermedios de alto peso molecular (NF-200) como un marcador axonal (Lee & Shea, 2014), la segunda fue la espinofilina como indicador de las espinas dendríticas de las neuronas (Barnes et al., 2004), la tercera fue la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP-2) como marcador dendrítico (Sánchez et al., 2000) y la cuarta fue la proteína básica de mielina (MBP) como indicador de los oligodendrocitos (Boggs, 2006). En todas las proteínas evaluadas se observaron expresiones similares entre los grupos sham y los lesionados SS y AL después de 5 semanas de tratamiento.

Respecto a los NF-200 se observó que en la corteza del lado lesionado los grupos SS y AL tuvieron una expresión muy similar en comparación con el grupo sham, mientras que la expresión de esta misma proteína en las muestras de hipocampo tampoco mostró diferencias significativas, sin embargo, llama la atención que en el hipocampo se observó casi 50% menos expresión de NF-200 en las muestras del grupo con HI tratado con AL en comparación con el grupo sham, estos resultados se pueden observar en la Gráfica 16.



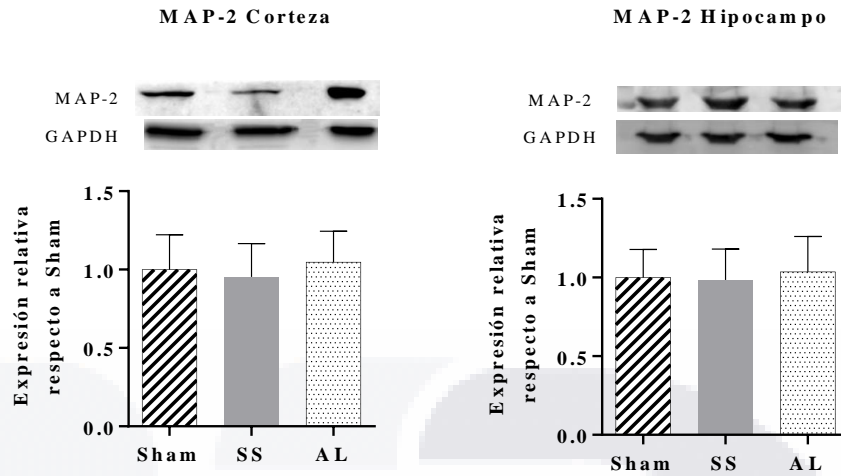
Gráfica 16. Inmunotransferencias representativas de la expresión de NF-200 en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento (n=3). Las expresiones se normalizaron con el grupo sham. Los datos están representados con medias ± error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Respecto a la espinofilina, se observó que la expresión en corteza fue ligeramente menor en ambos grupos lesionados con respecto a sham siendo más evidente en el grupo de SS, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas; por otro lado, la expresión de espinofilina en el hipocampo lesionado fue muy similar entre los tres grupos (Gráfica 17).



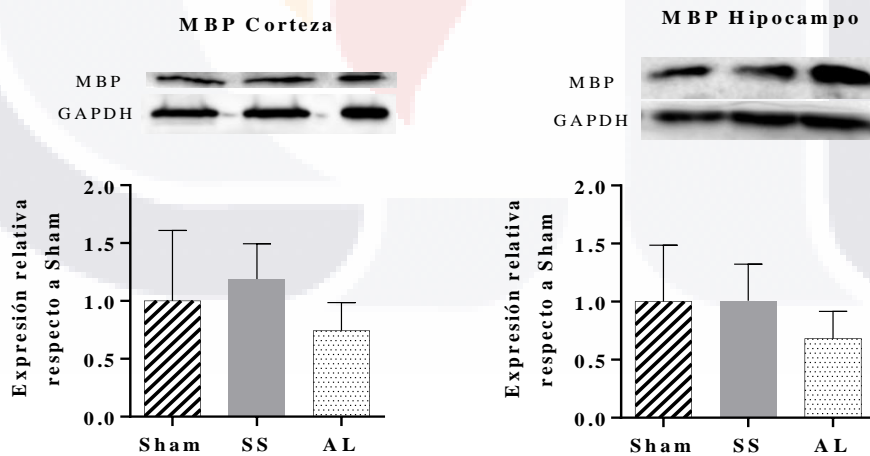
Gráfica 17. Inmunotransferencias representativas de la expresión de espinofilina en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento (n=4). Las expresiones se normalizaron con el grupo sham. Los datos están representados con medias \pm error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

La proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) mostró prácticamente la misma expresión en los tres grupos evaluados, lo que indicaría que la expresión dendrítica se mantuvo, o bien, se recuperó en los grupos que sufrieron la lesión hipóxico-isquémica en los primeros días postnatales. Estos resultados se pueden observar en la Gráfica 18.



Gráfica 18. Inmunotransferencias representativas de la expresión de MAP-2 en corteza e hipocampo de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento (n=5). Las expresiones se normalizaron con el grupo sham. Los datos están representados con medias ± error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Finalmente, al evaluar la MBP nuevamente se observaron resultados similares en los grupos lesionados SS y AL con respecto al grupo sham lo que indicaría que la mielinización de las neuronas fue muy similar (ver Gráfica 19).



Gráfica 19. Inmunotransferencias representativas de la expresión de MBP en corteza (n=5) e hipocampo (n=4) de los grupos sham, SS y AL a las 5 semanas de tratamiento. Las expresiones se normalizaron con el grupo sham. Los datos están representados con medias ± error estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados de la evaluación histológica

Se realizó el conteo de neuronas en las 5 zonas en las que se dividió el giro dentado del hipocampo, sin embargo, el número de neuronas fue muy similar entre los tres grupos, en la Figura 21 se pueden observar las fotomicrografías representativas del conteo de neuronas y en la Gráfica 20 los promedios de los conteos en todas las zonas.

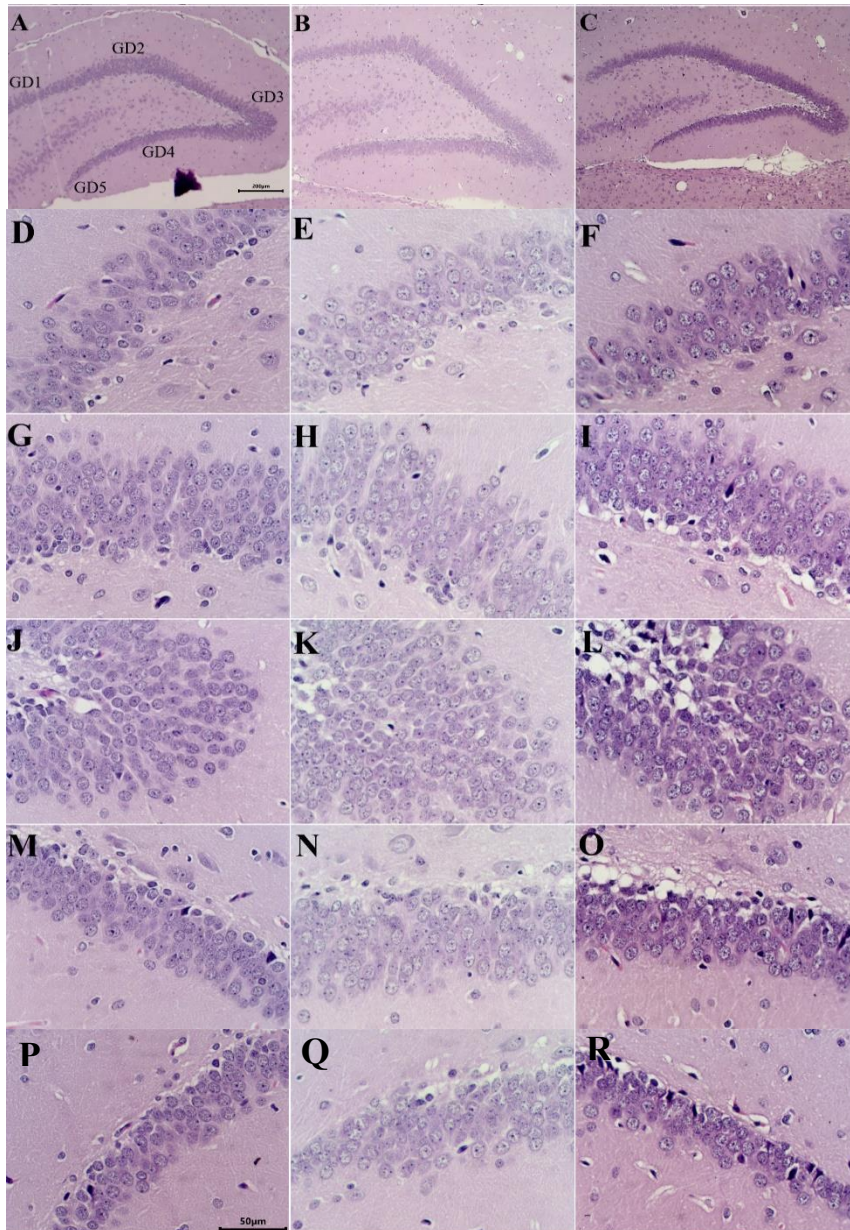
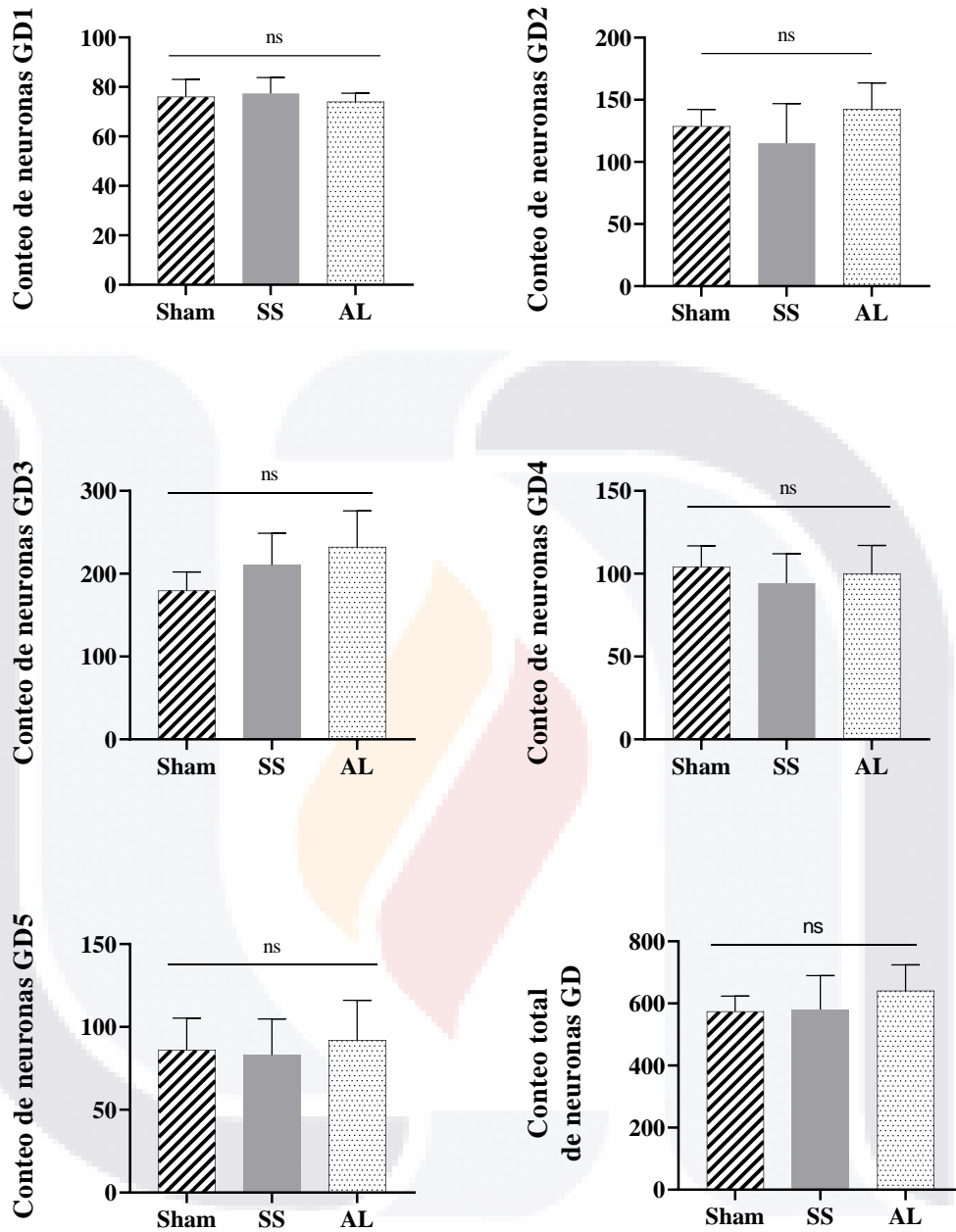


Figura 21. Fotomicrografías representativas del giro dentado (GD) del hipocampo del hemisferio derecho para los grupos sham (A), SS (B) y AL (C), tinción con H & E. Fotografías tomadas a 20X. Barra de calibración 200 µm. En la foto A se pueden observar las zonas en las que se dividió el GD para el conteo de neuronas. Las fotomicrografías de la D-R se tomaron a 40X, siendo D, G, J, M y P representativas del grupo sham, E, H, K, N, O del grupo SS y F, I, L, O y R del grupo AL. D-F zona GD1, G-I zona GD2, J-L zona GD3. M-O zona GD4 y P-R zona GD5. Barra de calibración 50 µm.



Gráfica 20. Comparación del conteo de neuronas en las 5 zonas en las que se dividió el giro dentado del hipocampo para los grupos sham, SS y AL, n= 3. Los datos están representados con medias \pm desviación estándar. Se realizaron comparaciones múltiples por la prueba de ANOVA y post-hoc de Tukey y se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Discusión

La hipotermia se seleccionó como el mejor anestésico para llevar a cabo la cirugía isquémica en ratas de 7 días posnatales. En estudios previos se ha demostrado que incluso una hipotermia leve en ratas tiene un efecto similar a la administración de una dosis de morfina de 10 mg/kg, pudiendo tener una duración de hasta 30 minutos (Phifer & Terry, 1986). Asimismo, la hipotermia es viable como método anestésico en roedores neonatos ya que son poiquiloterms durante las 2 primeras semanas de vida, es decir, su temperatura corporal y tasa metabólica están relacionadas con la temperatura ambiental, su superficie corporal es pequeña por lo que es fácil conseguir bajar la temperatura y tienen una mayor resistencia a la detención del suministro de sangre del cerebro; entre los beneficios de la anestesia por hipotermia es que se disminuye el riesgo de canibalismo, sangrado y no afecta en las pruebas de memoria o aprendizaje en las ratas neonatas (Boston University Research Support, 2019; Phifer & Terry, 1986); por otro lado, el uso de agentes anestésicos volátiles sin una cámara de anestesia adecuada puede ser riesgoso para el personal que realiza la cirugía y el éter al ser un producto altamente inflamable y tóxico se ha recomendado no utilizarlo como anestésico (Flecknell, 2009).

La hipoxia-isquemia neonatal afecta el desarrollo físico de las ratas, sobre todo en la ganancia de peso y la apertura ocular (Fan et al., 2009), mientras que en otro estudio se reportó que el uso prolongado del AL incrementa la expresión de ghrelina, hormona relacionada con el incremento del apetito, y también incrementa la expresión de lipoproteína lipasa, una enzima que participa en la regulación del suministro de ácidos grasos a los tejidos para su almacenamiento u oxidación (Olvera-Sandoval et al., 2018), ambas proteínas podrían revertir las alteraciones de los animales lesionados por HICP. Debido a lo antes mencionado en este estudio se decidió estandarizar tanto el tamaño de las camadas y el peso de los animales.

Al comparar los ángulos de las extremidades posteriores de las ratas sham con las ratas que tenían lesión hipóxico-isquémica no se encontraron diferencias significativas, aunque el primer día de evaluación los ángulos fueron en promedio ligeramente mayores; no obstante, en los días posteriores este ángulo fue disminuyendo en las ratas lesionadas, mientras que en las ratas sham este ángulo permaneció estable a lo largo del tiempo. Por su parte, Feather-Shulsser & Ferguson (2016) evidenciaron que los ángulos de las extremidades posteriores fueron

significativamente mayores a las 24 horas de la lesión en ratones con hipoxia-isquemia en comparación con los sham, argumentando que los roedores necesitan aumentar el ángulo de sus patas traseras para estabilizar su marcha y ayudar con el equilibrio y la coordinación, en nuestro estudio hubo una alta variabilidad en las mediciones de los ángulos de las extremidades posteriores de las ratas con hipoxia-isquemia así que eso podría explicar en parte que no se haya alcanzado a encontrar una diferencia significativa. En contraste, Bellot et al., (2014) encontró que el ángulo que existía entre las extremidades posteriores de los animales con lesiones isquémicas era menor que el de los controles; esto evidenciaba una asimetría postural y con ello menor estabilidad, lo que podría explicar lo encontrado en nuestro estudio los días posteriores de la lesión.

En la evaluación de la marcha del grupo control se observó una caminata con movimientos simétricos de las extremidades desde el día posnatal 8 mientras que las ratas con lesión por HICP presentaron incapacidad para caminar, o bien, caminata con movimiento asimétrico de las extremidades, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Feathers-Shussler & Ferguson (2016), quienes reportaron una menor puntuación promedio en la evaluación de la marcha en el grupo de ratas con parálisis cerebral en comparación con el grupo sham, asimismo los investigadores observaron una recuperación de la función motora con puntuaciones similares en ambos grupos a la semana de haber realizado la lesión por HICP. Adicionalmente, a las 72 horas de la lesión por HICP se observó que algunas ratas de nuestro estudio presentaban hiperactividad, estos mismos resultados fueron reportados previamente por otros investigadores (Fan et al., 2005; Lubics et al., 2005), dicha hiperactividad podría deberse a lesiones en axones y dendritas de neuronas hipocámpicas, pues se ha reportado que las neuronas de la región CA1 son especialmente sensibles al daño por hipoxia-isquemia (Cengiz et al., 2019; Gaudet et al., 2016).

Respecto a la evaluación del reflejo de enderezamiento se observó que las ratas con lesión por HICP presentaron tiempos de latencia promedio más prolongados a las 24 horas de haber realizado la lesión, prácticamente el doble del tiempo de las ratas controles, resultados similares fueron descritos previamente en ratas con lesiones por hipoxia isquemia (Feather-Shussler & Ferguson, 2016; Fan et al., 2005), por lo tanto la evaluación del reflejo de enderezamiento resulta ser un buen indicador para evaluar la coordinación motora por probable disfunción subcortical (Waddell et al., 2016), en este estudio además se observó la dirección del giro

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

durante la evaluación del reflejo de enderezamiento; sin embargo, no se encontró que hubiera preferencia por un lado (derecha o izquierda) en las ratas lesionadas, cabe mencionar que en la evaluación del reflejo de enderezamiento no se hace esta observación pero en nuestro estudio decidimos evaluarla con el fin de observar si la lesión permitía una mejor coordinación motora en el lado contralateral del cuerpo con respecto a la lesión.

Lo que llama la atención de las diferentes evaluaciones realizadas es que las ratas recuperan gran parte de sus funciones entre las 48 y 72 horas posteriores a la lesión. El modelo de lesión cerebral por hipoxia-isquemia produce atrofia extensa del cerebro de las ratas, afectando áreas como la corteza sensomotora, ganglios basales, el hipocampo y/o zona subventricular (Rocha-Ferreira & Hristova, 2016); pero, a diferencia de los bebés recién nacidos, las ratas con lesiones hipóxico-isquémicas no muestran déficits funcionales graves (Jansen & Low, 1996), como pudo observarse después de 48 horas de su lesión se mueven como animales normales y no muestran cambios posturales o locomotores tan obvios. En parte puede deberse a la mayor plasticidad del cerebro de las ratas neonatas en comparación con el cerebro humano.

Al realizar la prueba de campo abierto se pudo observar que no había un deterioro locomotor evidente a pesar del daño hipóxico-isquémico; sin embargo, en el día postnatal 33, es decir, a las 4 semanas de tratamiento, las ratas tratadas con SS tuvieron un estado de mayor ansiedad en comparación con los grupos sham y las ratas tratadas con AL, esto fue evidenciado por una menor frecuencia de entradas a la zona central de la arena del campo abierto y una menor actividad total, ambos parámetros son buenos indicadores de la ansiedad debido a que la zona central representa un área estresante para las ratas pues tienen aversión por los espacios abiertos, desconocidos y luminosos (Seibenhener & Wooten, 2015) mientras que una baja actividad también es indicativo de conducta ansiosa en roedores (Balduini et al., 2000; Barth & Stanfield, 1990; Rojas et al., 2013). Estos mismos resultados fueron encontrados por Gotchac et al., (2021) quienes realizaron un daño hipóxico-isquémico leve y encontraron que la función motora de las ratas no se veía afectada, sin embargo, las ratas lesionadas mostraban una conducta más ansiosa, la cual fue asociada a una neurodegeneración en el giro dentado y la zona CA1 del hipocampo.

La prueba rota rod se realizó en los días postnatales 37 al 41 para evaluar la coordinación sensoriomotora dependiente del cerebelo, sin embargo, la lesión HI no indujo déficits

funcionales en los parámetros evaluados entre los grupos con lesión y el grupo sham. Esto podría explicarse por la extraordinaria plasticidad del cerebro neonatal, lo que permite mecanismos compensatorios tales como el cambio de control de la coordinación motora desde un área cerebral dañada a una ilesa, lo que coincide con los resultados encontrados por otros autores aún después de lesiones HI de leves a graves (Balduini et al., 2000; Barth & Stanfield, 1990; Rojas et al., 2013). Por otro lado, Borjini et al., (2019) reportó diferencias significativas en ratas con HI en un protocolo de 2 días para la prueba de rota rod, en donde identificó que el mantener una velocidad constante de 20 rpm durante 3 min las ratas del grupo sham permanecían más tiempo en el equipo en comparación con las ratas lesionadas (día de habituación), adicionalmente 24 h posterior a la habituación realizó nuevamente la prueba a una aceleración de 16 a 40 rpm durante 6 min y comparó la latencia de la primer caída, el número de caídas y el tiempo que las ratas permanecían en el aparato, encontrando resultados significativamente mejores en el grupo sham. Estas modificaciones en el protocolo de la prueba de rota rod podrían aplicarse en futuros estudios con ratas que tengan lesión HI para evaluar la efectividad de un tratamiento en la coordinación motora.

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso permite la evaluación de la memoria declarativa aprovechando la tendencia de las ratas de explorar objetos novedosos en comparación con objetos familiares o conocidos, además de que permite evaluar la memoria a largo plazo en tiempos de retención de 24 h o más, identificando así el deterioro o daño en el hipocampo y la corteza perirrinal (Clark & Martin, 2005; Cole et al., 2019). En nuestro estudio se encontró que tanto el grupo sham como los grupos lesionados tuvieron un porcentaje total de investigación del objeto novedoso por arriba del 50%, indicando que la memoria declarativa a largo plazo se mantuvo a pesar de la lesión, esto podría explicarse con lo encontrado por Broadbent et al., (2004) quienes observaron que animales con lesiones del 50 al 75 % de la superficie del hipocampo seguían mostrando resultados adecuados en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, en cambio lesiones del 75 al 100% del hipocampo mostraron deficiencias significativas en la memoria declarativa presentando alteración en los resultados de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso; debido a que el modelo de lesión HI que se utilizó en nuestro estudio fue leve y que no es exclusivo de daño al hipocampo, se pudieron haber presentado lesiones de tamaño heterogéneo en esta estructura cerebral lo que favoreció que las ratas tuvieran un desempeño favorable en la memoria declarativa después de 3 semanas de haber generado la lesión. Adicionalmente, la manipulación constante de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

animales y el favorecer un ambiente enriquecido también puede recuperar los déficits en la memoria declarativa, lo que coincide con lo encontrado por Rojas et al., (2013) quienes observaron que el enriquecimiento ambiental 15 días después de la lesión HI neonatal corregía los déficits en la memoria declarativa. Dado que se procuró que los animales de nuestro estudio tuvieran objetos como rollos de papel, tubos de PVC y hasta juguetes de plástico para enriquecimiento ambiental y eran constantemente manipulados y sometidos a diferentes pruebas, pudiera haber influido en el desempeño de la prueba.

Por lo mencionado en nuestro estudio se incluyó una prueba para evaluar la memoria espacial a largo plazo, pues lesiones menores del hipocampo (30 al 50%) pueden causar alteraciones en las pruebas que evalúan la memoria espacial (Broadbent et al., 2004). En nuestro estudio se utilizó la *prueba de reconocimiento de lugar* en la cual se observó que los animales con lesión HI dedicaron un menor tiempo de exploración al objeto en la ubicación novedosa; sin embargo solo aquellos que fueron tratados con el AL tuvieron alteraciones significativas en la memoria espacial en comparación con el grupo sham, estos resultados son contradictorios a lo que se esperaba, no obstante se ha descrito en estudios previos que el uso de agonistas de la GnRH en la etapa peri puberal afecta el desempeño en pruebas de memoria espacial (Hough, Bellingham, Haraldsen, McLaughlin, Rennie, et al., 2017; Hough, Bellingham, Haraldsen, McLaughlin, Robinson, et al., 2017), esto puede deberse a que el uso de los agonistas de la GnRH se acompaña de cambios en la expresión de genes con función endócrina y genes que participan en la plasticidad del hipocampo (Nuruddin, Wojniusz, et al., 2013), así mismo se ha identificado que el tratamiento con GnRH también incrementa el tamaño de la amígdala (Nuruddin, Bruchhage, et al., 2013). Es importante mencionar que los resultados de la *prueba de reconocimiento de lugar* se pueden ver afectados cuando hay lesiones en otras estructuras cerebrales además del hipocampo, como la corteza entorrinal media y lateral, la corteza cingulada anterior, corteza retroesplenial y corteza parietal, así como sitios diencefálicos, sobre todo los núcleos talámicos anteriores y los cuerpos mamilares (Aggleton & Nelson, 2020). El hecho de que las ratas del grupo de SS sólo mostraran una tendencia a una menor exploración del objeto en la nueva ubicación, pero esta diferencia no fue significativa, pudiendo explicarse por el enriquecimiento ambiental, el cual puede recuperar los déficits en la memoria espacial, sin tener un efecto sobre la atrofia del hipocampo o de la corteza cerebral (Pereira et al., 2007; Rojas et al., 2013).

La memoria espacial a corto plazo se evaluó utilizando la *prueba de laberinto en Y* mediante la alternancia espontánea (Ijomone & Biose, 2019) donde se comparó el % de alternancia, el número de veces que la rata se erguía en dos patas y la velocidad promedio a la que se desplazaron las ratas durante la prueba, en esta prueba no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas y de acuerdo con los análisis estadísticos esta prueba no es confiable para evaluar la memoria espacial a corto plazo en lesión por HI en la etapa neonatal, por lo que se sugeriría que en futuros estudios se considere un protocolo diferente del laberinto en Y para la evaluación de la memoria especial a corto plazo.

Una de las principales cascadas de daño en la lesión HI es la inflamación exacerbada (Hagberg et al., 2015; Kaur et al., 2013) tanto la glía como las células inmunes sistémicas liberan citocinas y factores citotóxicos que pueden exacerbar el daño neuronal (Barrios-Anderson et al., 2019); en estudios previos se ha descrito que la GnRH tiene actividad inmunomoduladora (Quintanar & Guzmán-Soto, 2013) por ello se evaluó la expresión del mRNA de dos importantes interleucinas con actividad proinflamatoria, la IL-1 β y el TNF- α , observándose una expresión similar de ambas citocinas en las ratas sham y las ratas con HI tratadas con el AL; mientras que los animales con HI tratados con SS tuvieron una expresión 17 veces mayor del mRNA para la IL-1 β y 12 veces mayor de TNF- α con respecto al grupo sham, con estos resultados se demostró que 72 horas posteriores a la lesión el tratamiento con el agonista de la GnRH tuvo una atenuación del proceso inflamatorio. Estos resultados son importantes porque la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias tendría una atenuación parcial del daño neuroinflamatorio provocado en la *tercera fase de lesión* que sigue a un evento hipóxico-isquémico cerebral neonatal (Pedroza-García et al., 2022). Estos mismos resultados fueron encontrados por Guzmán-Soto et al., (2016) en un modelo de encefalopatía autoinmune experimental, pues observaron que animales que fueron tratados con AL tuvieron una menor expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-17A y TNF- α , esta disminución se vio asociada a la menor activación de la vía NF- κ B. Se ha demostrado que la microglía activada puede liberar IL-1 β y TNF- α causando daño citotóxico y causando la muerte de los oligodendrocitos (Traiffort et al., 2020). Además, el TNF- α se asocia con respuesta Th1, e induce la expresión de proteínas de adhesión, factores quimioatrayentes y mayor número de citocinas a través de la activación de NF- κ B (Jang et al., 2021). Una posible explicación de la atenuación en la expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias podría deberse a que varias células del sistema inmune expresan el receptor a GnRH, entre las que se incluye la

microglía (Wang et al., 2023), los monocitos/macrófagos, los linfocitos (Chen et al., 1999), timocitos y esplenocitos (Marchetti et al., 1989). Min et al., (2009) demostró el efecto inmunomodulador de la GnRH sobre macrófagos peritoneales al tratar de inducir respuesta inflamatoria con lipopolisacárido/INF- γ , demostrando que había una regulación a la baja en la producción de ON, mediante la supresión de las enzimas iONS y COX-2 y el incremento del calcio citosólico en los macrófagos, además de demostrar una menor activación de la vía NF- κ B.

Adicionalmente en nuestro estudio se evaluó la activación de la vía de NF- κ B a través de la medición de la expresión proteica del inhibidor I κ B α (I κ B α), el cual tiene como función arrestar el NF- κ B en el citosol para evitar la traslocación al núcleo y la consecuente síntesis de mensajeros que favorezcan la producción de citocinas proinflamatorias, de igual manera se evaluó la expresión proteica del inhibidor I κ B α fosforilado (p-I κ B α), es decir cuando se permite la traslocación del NF- κ B al núcleo (Kielland et al., 2012) y la relación entre ambos p-I κ B α /I κ B α . Los resultados mostraron que en comparación con el grupo sham, tanto SS como AL tuvieron un incremento casi del doble en la expresión de p-I κ B α en la corteza e hipocampo del lado lesionado sin embargo estas diferencias no fueron significativas, en el caso de los animales tratados con AL no sorprende este resultado ya que se esperaría que esta vía estuviera regulada a la baja debido a la acción del agonista de la GnRH (Guzmán-Soto et al., 2016; Min et al., 2009); por otro lado, en el grupo tratado con SS no se esperaría este resultado ya que la expresión de las citocinas proinflamatorias fue mayor, esto puede deberse a que la lesión HI activó otras vías para el inicio de la inflamación como la vía JAK/STAT, la cual no se ve afectada por el tratamiento con GnRH o sus agonistas (Min et al., 2009).

Pese a los resultados alentadores sobre el efecto inmunomodulador del AL en la lesión por HI, es importante investigar más, pues hay resultados contradictorios del efecto de la GnRH o sus agonistas sobre la microglía, como lo demostraron Wang et al., (2023) quienes observaron la administración de AL en cultivos celulares de microglía, generó una polarización M1 de la microglía favoreciendo estados proinflamatorios. Por otro lado, es importante evaluar la seguridad de administrar un agonista de la GnRH en recién nacidos, pues en un estudio realizado en monos Rhesus a los cuales se les administró un agonista de la GnRH en la etapa neonatal (10 μ g/día) a partir de los 10 o 13 días postnatales y hasta los 4 meses de edad, se observó que durante el periodo neonatal se privó al sistema inmunitario de la sensibilidad normal a la GnRH y los monos tuvieron niveles séricos mínimos de células T durante el

tratamiento siendo más susceptibles a algunas infecciones, mientras que en la edad adulta expresaron un porcentaje más alto de linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos) y los linfocitos B estaban reducidos en comparación con el grupo control, además los linfocitos tenían una respuesta proliferativa elevada a los mitógenos (Mann et al., 1994).

Se ha demostrado que la GnRH o sus agonistas tienen un papel neurotrófico; en estudios previos se observó un mayor crecimiento de las neuritas y expresión de neurofilamentos en cultivos corticales de neuronas de rata a los que se les administró la GnRH (Quintanar & Salinas, 2008). Además, es posible que la GnRH ejerza sus acciones a través de la regulación de sitios específicos que responden al efecto de hormonas sexuales como el estradiol, del cual se sabe que tiene un papel importante en la neuroplasticidad y neuroprotección de estructuras como el hipocampo después de un evento isquémico (Chamniansawat & Chongthammakun, 2012). Por ello en nuestro estudio se evaluaron proteínas estructurales de la neurona, como el marcador de neurofilamentos intermedios de alto peso molecular (NF-200), la espinofilina y la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP-2), además del marcador de oligodendrocitos, la proteína básica de mielina (MBP), sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de estas proteínas posterior a la lesión por HI. Una posible explicación es que las ratas son más resistentes al daño hipóxico-isquémico (Larsen et al., 2008) y dado que nuestro modelo consistió en una lesión leve, estos marcadores no se alteraron al grado de obtener cambios significativos. Por otro lado, el deficiente incremento en la expresión de algunas de las proteínas evaluadas a pesar del tratamiento con el agonista de la GNRH con respecto a lo reportado por otros autores como el incremento en la expresión de la espinofilina (Prange-Kiel et al., 2008; Quintanar et al., 2016) los NF-200 (Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012; Díaz-Galindo et al., 2015; Quintanar et al., 2016) o MAP-2 (Hernández-Jasso et al., 2020) en otros modelos de lesión, puede deberse al efecto de la hormona inhibidora de la gonadotropina (GnIH) de origen astrocítico, la cual se ha descrito que en ratas es producida en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (Kriegsfeld et al., 2006), sin embargo recientemente se describió una abundancia de astrocitos positivos a GnIH en hipocampo de rata, lo que sugiere que esta proteína puede ser producida localmente y por lo tanto tenga un efecto atenuante de la GnRH o sus agonistas en esta estructura cerebral (Ferris et al., 2015) a diferencia de lo observado en otras partes del sistema nervioso.

Finalmente, respecto a la evaluación histológica se observó que el conteo de neuronas a nivel del hipocampo fue similar en los tres grupos a las 5 semanas de tratamiento, llama la atención que incluso el grupo lesionado que sólo recibió SS tuviera conteos similares de neuronas, este resultado podría explicarse debido a la característica neurogénica del hipocampo, especialmente en el giro dentado, lo que implica que pueden generarse neuronas nuevas después de la lesión HI. Altman & Das, (1965) demostraron que en ratas neonatas se presenta un incremento de hasta 6 veces el número de células granulares diferenciadas en el giro dentado del hipocampo a los 3 meses de edad, proceso que permanece a lo largo de la vida en los roedores generando nuevas neuronas granulares a partir de una población de células progenitoras en continua división que residen en la zona subgranular del giro dentado (Kuhn et al., 1996), además, estos mismos resultados también se han observado en el giro dentado del hipocampo en el humano (Eriksson et al., 1998). Cabe señalar que también se esperaría una mayor recuperación de los animales lesionados debido a que nuestro modelo de HICP es leve, y en situaciones de mayor gravedad no se observan estos cambios (Olson & McKeon, 2004).

Entre las limitaciones del estudio pudiera considerarse realizar el estudio en animales de un solo sexo ya que se han reportado dimorfismo sexual en los resultados del daño hipóxico isquémico siendo más grave en los machos el daño oxidativo mientras que en las hembras se han observado mayores déficits en la memoria (Netto et al., 2017), por otro lado, valdría la pena probar un modelo de lesión de mayor gravedad con el objetivo de observar si el tratamiento con AL tiene mayor alcance, esto podría lograrse incrementando los tiempos de la hipoxia a 90 o 120 min, pues tiempos de hipoxia mayores favorecen encefalopatías de moderadas a graves (Millar et al., 2017), o bien, utilizar un modelo de ligadura bilateral de las carótidas (Uehara et al., 1999). Respecto a las pruebas para evaluar la memoria espacial se optó por utilizar la *prueba de reconocimiento de lugar*, sin embargo, una prueba más aceptada en modelos de hipoxia-isquemia es el laberinto acuático de Morris, la cual consideramos realizar al inicio del estudio; no obstante, por cuestiones de logística y la pandemia que se presentó durante la realización del doctorado tuvo que descartarse. También vale la pena mencionar que la prueba de rota rod aunque es una excelente prueba para evaluar la coordinación sensoriomotora tuvo algunas limitantes en su realización ya que al equipo le faltaban paredes divisorias entre carriles y esto dificultó en gran medida la realización de la prueba ya que las ratas aprendían a escapar del equipo para evitar realizar la prueba completa situación que requirió de más ensayos en algunos animales. Finalmente, para verificar si el AL tiene un efecto

directo en la inmunomodulación de la vía NF- κ B valdría la pena evaluar otros factores que participan en la vía de señalización y activación (Wu et al., 2019).

En lo referente a las perspectivas del estudio, el AL podría ser considerado como un adyuvante en el tratamiento de la HICP debido al efecto inmunomodulador que presentó en la disminución de la expresión génica de citocinas proinflamatorias. Se requieren realizar diversos estudios donde se evalúe la efectividad de los agonistas de la GnRH en casos de moderados a graves de HICP, además valdría la pena comparar el uso del AL con otros tratamientos antiinflamatorios y ver si brinda beneficios extras debido a las propiedades neuroregeneradoras que ha presentado en otros modelos de lesión, adicionalmente se recomienda evaluar la seguridad de su uso en la etapa neonatal y su efecto a largo plazo tanto en la función inmune como en el desarrollo del niño. Más investigaciones son necesarias para esclarecer estos puntos.

Conclusiones

La hipoxia-isquemia cerebral perinatal (HICP) es una condición grave que puede originar parálisis cerebral, un trastorno motor que afecta la calidad de vida de quien la padece, el uso del acetato de leupolida (AL), un agonista de la GnRH se ha propuesto como un tratamiento coadyuvante para corregir el daño originado por la HICP. En nuestro estudio encontramos que el AL tiene un papel inmunomodulador si es administrado en las primeras horas después de una lesión favoreciendo la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y TNF- α , además de prevenir la conducta de ansiedad en un modelo de HICP en ratas. No se observaron cambios en la función motora o en la función cognitiva de las ratas lesionadas tratadas con AL. Aún hace falta realizar más estudios sobre la seguridad del uso de los agonistas de la GnRH en la etapa neonatal y las posibles consecuencias sobre el sistema inmunológico y el desarrollo sexual.

Referencias

- Agarwal, A., & Verma, I. (2012). Cerebral palsy in children: An overview. *J Clin Orthop Trauma*, 3(2), 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2012.09.001>
- Agency for Clinical Innovation. (2018). *Management of Cerebral Palsy in Children: A Guide for Allied Health Professionals* (pp. 7–126). NSW Ministry of Health.
- Aggleton, J. P., & Nelson, A. J. D. (2020). Distributed interactive brain circuits for object-in-place memory: A place for time? *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 2398212820933471. <https://doi.org/10.1177/2398212820933471>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Badawi, N., Kurinczuk, J. J., Keogh, J. M., Alessandri, L. M., O’Sullivan, F., Burton, P. R., Pemberton, P. J., & Stanley, F. J. (1998). Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ*, 317(7172), 1554–1558. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7172.1554>
- Badr, M., & Pelletier, G. (1987). Characterization and autoradiographic localization of LHRH receptors in the rat brain. *Synapse*, 1(6), 567–571. <https://doi.org/10.1002/syn.890010609>
- Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., & Cimino, M. (2000). Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research*, 859(2), 318–325. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01997-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01997-1)
- Barnes, A. P., Smith, F. D., Van Dongen, H. M., VanDongen, A. M. J., & Milgram, S. L. (2004). The identification of a second actin-binding region in spinophilin/neurabin II. *Molecular Brain Research*, 124(2), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.12.020>

- Barrios-Anderson, A., Chen, X., Nakada, S., Chen, R., Lim, Y.-P., & Stonestreet, B. S. (2019). Inter-alpha Inhibitor Proteins Modulate Neuroinflammatory Biomarkers After Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 78(8), 742–755. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlz051>
- Barth, T. M., & Stanfield, B. B. (1990). The recovery of forelimb-placing behavior in rats with neonatal unilateral cortical damage involves the remaining hemisphere. *The Journal of Neuroscience*, 10(10), 3449. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-10-03449.1990>
- Blumenfeld, Z. (2017). Investigational and experimental GnRH analogs and associated neurotransmitters. *Expert Opin Investig Drugs*, 26(6), 661–667. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1323869>
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(17), 1945–1961. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7>
- Borjini, N., Sivilia, S., Giuliani, A., Fernandez, M., Giardino, L., Facchinetti, F., & Calzà, L. (2019). Potential biomarkers for neuroinflammation and neurodegeneration at short and long term after neonatal hypoxic-ischemic insult in rat. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1595-0>
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14515–14520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>
- Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2012). Gonadotropin-releasing hormone treatment improves locomotor activity, urinary function and neurofilament protein expression after spinal cord injury in ovariectomized rats. *Neurosci Lett*, 515(2), 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.052>
- Calderón-Vallejo, D., Quintanar-Stephano, A., Hernández-Jasso, I., Jiménez-Hernández, V., Ruiz-Ornelas, J., Jiménez, I., & Quintanar, J. L. (2015). Functional and structural recovery of the injured spinal cord in rats treated with gonadotropin-releasing hormone. *Neurochem Res*, 40(3), 455–462. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1486-9>
- Calzada Vázquez Vela, C., & Vidal Ruiz, C. A. (2014). Parálisis cerebral infantil: definición y clasificación a través de la historia. *Rev Mex Ortop Ped*, 16(1), 6–10.

- Camacho Ugarte, V., Bastida Codina, A., & Giovana Zarate, S. (2020). Estudio anatómico del hipocampo como una de las regiones de neurogénesis más relevante. *Revista Científica de Ciencias Médicas*, 23(2), 221–230. <https://orcid.org/0000-0003->
- Celik, Y., Resitoglu, B., Komur, M., Polat, A., Arslankoylu, A. E., Okuyaz, C., Erdogan, S., & Beydagi, H. (2016). Is levetiracetam neuroprotective in neonatal rats with hypoxic ischemic brain injury? *Bratisl Lek Listy*, 117(12), 730–733. https://doi.org/10.4149/BLL_2016_140
- Center for Disease Control and Prevention. (2018). *Data & Statistics for Cerebral Palsy* (Vol. 2019). CDC.
- Centro de Cirugía Especial de México IAP. (2017). *Estadísticas de Discapacidad en México* (Vol. 2019).
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2012). A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Experimental & Molecular Medicine*, 44(6), 403–411. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.6.046>
- Chen, H. F., Jeung, E. B., Stephenson, M., & Leung, P. C. (1999). Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(2), 743–750. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.2.5440>
- Cheng, C. K., & Leung, P. C. (2005). Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev*, 26(2), 283–306. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0039>
- Choi, D. W. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 11(10), 465–469.
- Chu, C., Gao, G., & Huang, W. (2008). Ischemia-reperfusion injury effects a change in expression of GnRH and its receptor in CA1 neurons in rat hippocampus. *International Journal of Neuroscience*, 118(3), 375–390. <https://doi.org/10.1080/00207450701392142>

- Chu, C., Xu, B., & Huang, W. (2010). GnRH analogue attenuated apoptosis of rat hippocampal neuron after ischemia-reperfusion injury. *J Mol Histol*, *41*(6), 387–393. <https://doi.org/10.1007/s10735-010-9300-8>
- Clark, R. E., & Martin, S. J. (2005). Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(5), 593–598. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.014>
- Cole, E., Simundic, A., Mossa, F. P., & Mumby, D. G. (2019). Assessing object-recognition memory in rats: Pitfalls of the existent tasks and the advantages of a new test. *Learning & Behavior*, *47*(2), 141–155. <https://doi.org/10.3758/s13420-018-0347-9>
- Deivaraju, C., Temple, H. T., Block, N., Robinson, P., & Schally, A. V. (2016). LHRH receptor expression in sarcomas of bone and soft tissue. *Horm Mol Biol Clin Investig*, *28*(2), 105–111. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0001>
- Delgado, M. R., & Albright, A. L. (2003). Movement disorders in children: definitions, classifications, and grading systems. *J Child Neurol*, *18 Suppl 1*, S1-8. <https://doi.org/10.1177/0883073803018001S0301>
- Demeši Drljan, Č., Mikov, A., Filipović, K., Tomašević-Todorović, S., Knežević, A., & Krasnik, R. (2016). Cerebral palsy in preterm infants. *Vojnosanit Pregl*, *73*(4), 343–348. <https://doi.org/10.2298/VSP140321019D>
- Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *JoVE*, *141*, e58593. <https://doi.org/doi:10.3791/58593>
- Díaz-Galindo, C., Gómez-González, B., Salinas, E., Calderón-Vallejo, D., Hernández-Jasso, I., Bautista, E., & Quintanar, J. L. (2015). Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regen Res*, *10*(11), 1819–1824. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.170311>
- Dolan, S., Evans, N. P., Richter, T. A., & Nolan, A. M. (2003). Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci Lett*, *346*(1–2), 120–122.

- Domínguez Escribà, L., Gómez Pinedo, U. A., & García Verdugo, J. M. (2009). *Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata* [Universidad de Valencia]. <http://hdl.handle.net/10803/31887>
- Drury, P. P., Gunn, E. R., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Clin Perinatol*, *41*(1), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.10.005>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, *4*(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *J Vis Exp*, *117*. <https://doi.org/10.3791/53569>
- Ferris, J. K., Tse, M. T., Hamson, D. K., Taves, M. D., Ma, C., McGuire, N., Arckens, L., Bentley, G. E., Galea, L. A. M., Floresco, S. B., & Soma, K. K. (2015). Neuronal Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) and Astrocytic Gonadotrophin Inhibitory Hormone (GnIH) Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, *27*(10), 772–786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jne.12307>
- Flanagan, C. A., & Manilall, A. (2017). Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8*, 274. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00274>
- Gotchac, J., Carroit, L., Thoby-Brisson, M., & Brissaud, O. (2021). A Rodent Model of Mild Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Frontiers in Neurology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.637947>
- Gründker, C., Günthert, A. R., Westphalen, S., & Emons, G. (2002). Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, *146*(1), 1–14.
- Gulati, S., & Sondhi, V. (2018). Cerebral Palsy: An Overview. *Indian J Pediatr*, *85*(11), 1006–1016. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2475-1>
- Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández-Jasso, I., & Quintanar, J. L. (2012). Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: a

possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochem Res*, 37(10), 2190–2197. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0842-x>

Guzmán-Soto, I., Salinas, E., & Quintanar, J. L. (2016). Leuprolide Acetate Inhibits Spinal Cord Inflammatory Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing NF- κ B Activation. *Neuroimmunomodulation*, 23(1), 33–40. <https://doi.org/10.1159/000438927>

Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 11(4), 192–208. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.13>

Hernández-Jasso, I., Domínguez-del-Toro, E., Delgado-García, J. M., & Quintanar, J. L. (2020). Recovery of sciatic nerve with complete transection in rats treated with leuprolide acetate: A gonadotropin-releasing hormone agonist. *Neuroscience Letters*, 739. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135439>

Hollung, S. J., Vik, T., Lydersen, S., Bakken, I. J., & Andersen, G. L. (2018). Decreasing prevalence and severity of cerebral palsy in Norway among children born 1999 to 2010 concomitant with improvements in perinatal health. *Eur J Paediatr Neurol*, 22(5), 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.05.001>

Hough, D., Bellingham, M., Haraldsen, I. R. H., McLaughlin, M., Rennie, M., Robinson, J. E., Solbakk, A. K., & Evans, N. P. (2017). Spatial memory is impaired by peripubertal GnRH agonist treatment and testosterone replacement in sheep. *Psychoneuroendocrinology*, 75, 173–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.10.016>

Hough, D., Bellingham, M., Haraldsen, I. R., McLaughlin, M., Robinson, J. E., Solbakk, A. K., & Evans, N. P. (2017). A reduction in long-term spatial memory persists after discontinuation of peripubertal GnRH agonist treatment in sheep. *Psychoneuroendocrinology*, 77, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.029>

Ijomone, O. M., & Biose, I. J. (2019). Effects of Dextromethorphan on Depressive-and Cognitive-Associated Behaviors: A Sexually Dimorphic Study. *Basic and Clinical Neuroscience*, 10(4), 393. <https://doi.org/10.32598/BCN.9.10.275>

- Jang, D., Lee, A. H., Shin, H.-Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Jennes, L., Eyigor, O., Janovick, J. A., & Conn, P. M. (1997). Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res*, 52, 471–475.
- Kaur, C., Rathnasamy, G., & Ling, E. A. (2013). Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1), 66–78. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9347-2>
- Khandaker, G., Muhit, M., Karim, T., Smithers-Sheedy, H., Novak, I., Jones, C., & Badawi, N. (2018). Epidemiology of cerebral palsy in Bangladesh: a population-based surveillance study. *Dev Med Child Neurol*. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14013>
- Kielland, A., Camassa, L. M. A., Døhlen, G., Munthe, L. A., Blomhoff, R., Amiry-Moghaddam, M., & Carlsen, H. (2012). NF- κ B Activity in Perinatal Brain During Infectious and Hypoxic-Ischemic Insults Revealed by a Reporter Mouse. *Brain Pathology*, 22(4), 499–510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00548.x>
- Kim, S. W., Jeon, H. R., Youk, T., & Kim, J. (2018). Cost of Rehabilitation Treatment of Patients With Cerebral Palsy in Korea. *Ann Rehabil Med*, 42(5), 722–729. <https://doi.org/10.5535/arm.2018.42.5.722>
- Komur, M., Okuyaz, C., Celik, Y., Resitoglu, B., Polat, A., Balci, S., Tamer, L., Erdogan, S., & Beydagi, H. (2014). Neuroprotective effect of levetiracetam on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Childs Nerv Syst*, 30(6), 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00381-014-2375-x>
- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., & Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2410–2415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511003103>

- Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., & Catt, K. J. (2009). The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(8), 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.05.002>
- Krsmanovic, L. Z., Mores, N., Navarro, C. E., Tomić, M., & Catt, K. J. (2001). Regulation of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclase in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*, *15*(3), 429–440. <https://doi.org/10.1210/mend.15.3.0610>
- Kuhn, H., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, *16*(6), 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>
- Lahlou, N., Carel, J. C., Chaussain, J. L., & Roger, M. (2000). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab*, *13 Suppl 1*, 723–737.
- Laptook, A. R., Corbett, R. J., Sterett, R., Garcia, D., & Tollefsbol, G. (1995). Quantitative relationship between brain temperature and energy utilization rate measured in vivo using ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res*, *38*(6), 919–925. <https://doi.org/10.1203/00006450-199512000-00015>
- Larsen, G. A., Skjellegrind, H. K., Vinje, M. L., & Berg-Johnsen, J. (2008). Mitochondria are More Resistant to Hypoxic Depolarization in the Newborn than in the Adult Brain. *Neurochemical Research*, *33*(9), 1894–1900. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9664-2>
- Lee, S., & Shea, T. B. (2014). The high molecular weight neurofilament subunit plays an essential role in axonal outgrowth and stabilization. *Biology Open*, *3*(10), 974–981. <https://doi.org/10.1242/bio.20149779>
- Lemyre, B., & Chau, V. (2018). Hypothermia for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*, *23*(4), 285–291. <https://doi.org/10.1093/pch/pxy028>
- Li, Y., Wisnowski, J. L., Chalak, L., Mathur, A. M., McKinstry, R. C., Licon, G., Mayoock, D. E., Chang, T., Van Meurs, K. P., Wu, T.-W., Ahmad, K. A., Cornet, M.-C., Rao, R., Scheffler, A., & Wu, Y. W. (2022). Mild hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE): timing

and pattern of MRI brain injury. *Pediatric Research*, 92(6), 1731–1736.
<https://doi.org/10.1038/s41390-022-02026-7>

Mann, D. R., Ansari, A. A., Akinbami, M. A., Wallen, K., Gould, K. G., & McClure, H. M. (1994). Neonatal treatment with luteinizing hormone-releasing hormone analogs alters peripheral lymphocyte subsets and cellular and humorally mediated immune responses in juvenile and adult male monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(2), 292–298. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.2.8106614>

Marchetti, B., Guarcello, V., Morale, M. C., Scapagnini, U., Farinella, Z., & Cordaro, S. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: Characteristics and biological function. *Endocrinology*, 125(2), 1025–1036.
<https://doi.org/10.1210/endo-125-2-1025>

Martínez Caire, S. (2015). *México registra 12 mil casos de parálisis cerebral al año* (Vol. 2019). Informador.mx.

Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci*, 11, 78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>

Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci*, 88(1–2), 5–28.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.032>

Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., & Maudsley, S. R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25(2), 235–275.
<https://doi.org/10.1210/er.2003-0002>

Min, J. Y., Park, M. H., Lee, J. K., Kim, H. J., & Park, Y. K. (2009). Gonadotropin-Releasing Hormone Modulates Immune System Function via the Nuclear Factor- κ B Pathway in Murine Raw264.7 Macrophages. *Neuroimmunomodulation*, 16(3), 177–184.
<https://doi.org/10.1159/000204231>

Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *The Journal of Neuroscience*, 41(12), 2541–2553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020>

- National Center for Biotechnology Information. (2019a). *GnRH1 gonadotropin releasing hormone 1 [Homo sapiens (human)]* (Vol. 2019). NCBI.
- National Center for Biotechnology Information. (2019b). *GnRH2 gonadotropin releasing hormone 2 [Homo sapiens (human)]* (Vol. 2019). NCBI.
- National Research Council of the National Academies. (2011). *Guide for the Care and use of Laboratory Animals* (8th ed.). American Academy Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Netto, C. A., Sanches, E., Odorcyk, F. K., Duran-Carabali, L. E., & Weis, S. N. (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 409–421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jnr.23828>
- Nuruddin, S., Bruchhage, M., Ropstad, E., Krogenæs, A., Evans, N. P., Robinson, J. E., Endestad, T., Westlye, L. T., Madison, C., & Haraldsen, I. R. H. (2013). Effects of peripubertal gonadotropin-releasing hormone agonist on brain development in sheep—A magnetic resonance imaging study. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 1994–2002. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.03.009>
- Nuruddin, S., Wojniusz, S., Ropstad, E., Krogenæs, A., Evans, N. P., Robinson, J. E., Solbakk, A.-K., Amiry-Moghaddam, M., & Haraldsen, I. R. H. (2013). Peri-pubertal gonadotropin-releasing hormone analog treatment affects hippocampus gene expression without changing spatial orientation in young sheep. *Behavioural Brain Research*, 242, 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.027>
- Olson, E. E., & McKeon, R. J. (2004). Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. *Journal of the Neurological Sciences*, 227(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.07.021>
- Oskoui, M., Coutinho, F., Dykeman, J., Jetté, N., & Pringsheim, T. (2013). An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*, 55(6), 509–519. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12080>
- Padmakar, S., Kumar, S. K., & Parveen, S. (2018). Management and Treatment for Cerebral Palsy in Children. *Indian Journal of Pharmacy Practice*, 11(2), 104–109. <https://doi.org/10.5530/ijopp.11.2.23>

- Palisano, R., Rosenbaum, P., Walter, S., Russell, D., Wood, E., & Galuppi, B. (1997). Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*, *39*(4), 214–223.
- Pedroza-García, K. A., Quintanar, J. L., & Calderón-Vallejo, D. (2022). Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy: Perspectives of Neuroprotective and Neuroregenerative Treatments. *Neuropediatrics*, *53*(06), 402–417. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1755235>
- Pereira, L. O., Arteni, N. S., Petersen, R. C., da Rocha, A. P., Achaval, M., & Netto, C. A. (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*(1), 101–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.07.003>
- Periti, P., Mazzei, T., & Mini, E. (2002). Clinical pharmacokinetics of depot leuporelin. *Clin Pharmacokinet*, *41*(7), 485–504. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241070-00003>
- Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R., & Harford, J. A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*, *593*, 113608. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608>
- Poblano, A., Arteaga, C., & García-Sánchez, G. (2009). Prevalence of early neurodevelopmental disabilities in Mexico: a systematic review. *Arq Neuropsiquiatr*, *67*(3A), 736–740.
- Postu, P. A., Sadiki, F. Z., el Idrissi, M., Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., & Hritcu, L. (2019). Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer’s amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *112*, 108673. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108673>
- Pozo Román, J., & Muñoz Calvo, M. T. (2015). Pubertad precoz y retraso puberal. *Pediatr Integral*, *19*(6), 389–410.
- Prange-Kiel, J., Jarry, H., Schoen, M., Kohlmann, P., Lohse, C., Zhou, L., & Rune, G. M. (2008). Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Cell Biology*, *180*(2), 417–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707043>

Prieto-Gómez, B., & Velázquez-Paniagua, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*, 45(6), 252–257.

Quaynor, S., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., Mores, N., Krsmanovic, L. Z., & Catt, K. J. (2007). Expression of a functional g protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*, 21(12), 3062–3070. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0207>

Quintanar, J. L., Calderón-Vallejo, D., & Hernández-Jasso, I. (2016). Effects of GnRH on Neurite Outgrowth, Neurofilament and Spinophilin Proteins Expression in Cultured Spinal Cord Neurons of Rat Embryos. *Neurochem Res*, 41(10), 2693–2698. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1983-0>

Quintanar, J. L., Díaz-Galindo, C., Calderón-Vallejo, D., Hernández-Jasso, I., Rojas, F., Medina-Aguñaga, D., & Olvera-Sandoval, C. (2018). Neurological improvement in patients with chronic spinal cord injury treated with leuprolide acetate, an agonist of GnRH. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 78(4), 352–357. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30624434>

Quintanar, J. L., & Guzmán-Soto, I. (2013). Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Front Integr Neurosci*, 7, 56. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00056>

Quintanar, J. L., & Salinas, E. (2008). Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochem Res*, 33(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9549-9>

Quintanar, J. L., Salinas, E., & Quintanar-Stephano, A. (2011). Gonadotropin-releasing hormone reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Neuropeptides*, 45(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.10.003>

Ramírez-Rodríguez, G., Laguna-Chimal, J., Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Méndez-Cuesta, L., Estrada-Camarena, E. M., & Babu, H. (2011). Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud Mental*, 34, 497–506. <https://www.researchgate.net/publication/262763819>

Rendon Tavera, A., Medinaveitia Villanueva, J. A., Arellano Saldaña, M. E., Olín Núñez, A., Viñals Labanino, C., Peralta Cruz, S., Del Valle Cabrera, M. G., & Vazquez Escamilla, J.

(2006). La clínica conjunta y permanente de parálisis cerebral espástica entre los servicios de ortopedia pediátrica, de rehabilitación y de comunicación humana del Instituto Nacional de Rehabilitación. *Acta Ortopédica Mexicana*, 20(4), 145–149.

Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 9(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>

Robertson, N. J., Tan, S., Groenendaal, F., van Bel, F., Juul, S. E., Bennet, L., Derrick, M., Back, S. A., Valdez, R. C., Northington, F., Gunn, A. J., & Mallard, C. (2012). Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? *The Journal of Pediatrics*, 160(4), 544-552.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.12.052>

Roch, G. J., Busby, E. R., & Sherwood, N. M. (2014). GnRH receptors and peptides: skating backward. *Gen Comp Endocrinol*, 209, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.025>

Rojas, J. J., Deniz, B. F., Miguel, P. M., Diaz, R., Hermel, É. do E.-S., Achaval, M., Netto, C. A., & Pereira, L. O. (2013). Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Experimental Neurology*, 241, 25–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.026>

Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., Goldstein, M., Bax, M., Damiano, D., Dan, B., & Jacobsson, B. (2007). A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl*, 109, 8–14.

Salmaso, N., Jablonska, B., Scafidi, J., Vaccarino, F. M., & Gallo, V. (2014). Neurobiology of premature brain injury. In *Nature Neuroscience* (Vol. 17, Issue 3, pp. 341–346). <https://doi.org/10.1038/nn.3604>

Sánchez, C., Díaz-Nido, J., & Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, 61(2), 133–168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00046-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00046-5)

- Schneider, R. E., Ng, P., Zhang, X., Andersen, J., Buckley, D., Fehlings, D., Kirton, A., Wood, E., van Rensburg, E., Shevell, M. I., & Oskoui, M. (2018). The Association Between Maternal Age and Cerebral Palsy Risk Factors. *Pediatr Neurol*, *82*, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2018.01.005>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *JoVE*, *96*, e52434. <https://doi.org/doi:10.3791/52434>
- Soria Soriano, E., & Sánchez Arizcuren, R. (2014). *Buenas prácticas. El cuidado y la promoción de la autonomía en personas con Parálisis Cerebral. Manual para el cuidador*. Gobierno de Aragón. Departamento de Seguridad, Bienestar Social y Familia.
- Soto, A., Camerino, O., Iglesias, X., Anguera, M. T., & Castañer, M. (2019). LINCE PLUS: Research Software for Behavior Video Analysis. *Apunts Educació Física i Esports*, *137*, 149–153. [https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.\(2019/3\).137.11](https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.(2019/3).137.11)
- Stavsky, M., Mor, O., Mastrolia, S. A., Greenbaum, S., Than, N. G., & Erez, O. (2017). Cerebral Palsy-Trends in Epidemiology and Recent Development in Prenatal Mechanisms of Disease, Treatment, and Prevention. *Front Pediatr*, *5*, 21. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00021>
- Teyler, T. J., & Discenna, P. (1984). The topological anatomy of the hippocampus: A clue to its function. *Brain Research Bulletin*, *12*(6), 711–719. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90152-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90152-7)
- Tonmukayakul, U., Shih, S. T. F., Bourke-Taylor, H., Imms, C., Reddiough, D., Cox, L., & Carter, R. (2018). Systematic review of the economic impact of cerebral palsy. *Res Dev Disabil*, *80*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2018.06.012>
- Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A., & Laouarem, Y. (2020). Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00079>
- Triulzi, F., Parazzini, C., & Righini, A. (2006). Patterns of damage in the mature neonatal brain. *Pediatr Radiol*, *36*(7), 608–620. <https://doi.org/10.1007/s00247-006-0203-5>

- Uehara, H., Yoshioka, H., Kawase, S., Nagai, H., Ohmae, T., Hasegawa, K., & Sawada, T. (1999). A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Research*, 837(1), 213–220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01675-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01675-3)
- van Bakel, M., Einarsson, I., Arnaud, C., Craig, S., Michelsen, S. I., Pildava, S., Uldall, P., & Cans, C. (2014). Monitoring the prevalence of severe intellectual disability in children across Europe: feasibility of a common database. *Dev Med Child Neurol*, 56(4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12281>
- Wang, F., Zhang, Z., Han, J., Zheng, J., Wang, X., & Wang, Z. (2023). Discovery of microglia gonadotropin-releasing hormone receptor and its potential role in polycystic ovarian syndrome. *Molecular Medicine Reports*, 27(4), 77. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12964>
- Weinstein, J. R., Koerner, I. P., & Möller, T. (2010). Microglia in ischemic brain injury. *Future Neurol*, 5(2), 227–246. <https://doi.org/10.2217/fnl.10.1>
- Wu, M., Liu, F., & Guo, Q. (2019). Quercetin attenuates hypoxia-ischemia induced brain injury in neonatal rats by inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105704>
- Zhang, Q., Ding, Y., Yao, Y., Yu, Y., Yang, L., & Cui, H. (2013). Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation. *PLoS One*, 8(12), e83589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083589>