



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA ARGENTINA  
SANTA MARIA DE LOS BUENOS AIRES  
Facultad de Psicología y Psicopedagogía  
Carrera de Psicología

TRABAJO DE INTEGRACIÓN FINAL

***Neuroprotección con Palmitoiletanolamida en el estriado,  
en un modelo murino de asfixia perinatal.  
Aproximación desde la Psicología Comparada.***

**Alumna:** Tamara Kobiec

**N° Registro:** 12-140054-7

**Director:** Dr. Francisco Capani

**Co-directora:** Lic. María Inés Herrera

**Fecha de entrega:** 7 de febrero de 2020

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. Asfixia perinatal .....	6
3.2. Modelo murino de asfixia perinatal .....	8
3.3. Estriado. ....	9
3.4. Neuroprotección .....	11
3.5. Palmitoiletanolamida .....	12
3.6. Psicología Comparada .....	13
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	15
4.1. Objetivos.....	15
4.2. Hipótesis.....	15
5. METODOLOGÍA .....	16
5.1. Animales de laboratorio .....	16
5.2. Definición de variables.....	16
5.3. Instrumentos .....	17
5.3.1. <i>Instrumentos para las pruebas de conducta</i> .....	17
5.3.2. <i>Instrumentos para el análisis morfológico</i> .....	17
5.3.3. <i>Instrumentos para el análisis molecular</i> .....	17
5.3.4. <i>Software de análisis de conducta</i> .....	18
5.3.4. <i>Software de análisis de imágenes</i> .....	18
5.3.4. <i>Software estadístico</i> .....	18
5.4. Procedimiento .....	18
5.4.1. <i>Procedimiento de recolección de datos</i> .....	19
5.4.2. <i>Procedimiento de análisis de datos</i> .....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1. Efectos conductuales en el día postnatal 30.....	23
6.2. Efectos morfológicos y bioquímicos en el día postnatal 30 .....	27
7. DISCUSIÓN .....	34
7.1. Efectos de la PA en el día postnatal 30.....	34
7.2. Efecto neuroprotector del tratamiento con PEA .....	37
7.3. Aplicaciones a la Psicología Comparada .....	39
8. CONCLUSIÓN .....	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
10. APÉNDICE.....	53

## 1. RESUMEN

La asfixia perinatal (PA) es una complicación obstétrica frecuente que consiste en una interrupción temporal en el suministro de oxígeno alrededor del nacimiento. Numerosas investigaciones han sugerido que la PA constituye un factor de riesgo para diversos trastornos del neurodesarrollo. Sin embargo, aún no se conoce el impacto de la PA en el estriado, una de las regiones cerebrales de mayor vulnerabilidad. Tampoco se ha encontrado una estrategia terapéutica eficaz para revertir los efectos deletéreos producidos por la PA. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la PA en el estriado y sus conductas asociadas, estudiando el grado de neuroprotección ejercida por la Palmitoiletanolamida (PEA), un mediador lipídico que ha mostrado eficacia en diversos modelos de injuria cerebral y neurodegeneración. Se utilizó el modelo murino de PA desarrollado por Bjelke, que constituye una valiosa herramienta experimental en el marco de la Psicología Comparada. Los animales fueron tratados con 10 mg/kg de PEA dentro de la primera hora de vida. Se realizaron estudios de conducta en el día postnatal 30 (Campo Abierto y Laberinto elevado en cruz), así como estudios morfológicos y bioquímicos. La PA produjo una desregulación en las conductas prototípicas de *rearing* y *grooming*, así como una reducción en la inmunoreactividad de los neurofilamentos fosforilados de peso molecular alto/medio (pNF-H/M), de la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y del número de astrocitos (GFAP+). El tratamiento con PEA normalizó el tiempo dedicado a las conductas prototípicas, restauró parcialmente el número de astrocitos GFAP+ y previno la disminución de la inmunoreactividad de pNF-H/M y MAP-2. Por lo tanto el tratamiento con PEA atenuó el daño estriatal inducido por la PA, demostrando su posible rol neuroprotector luego de la PA.

**Palabras clave:** asfixia perinatal – estriado – neuroprotección - Palmitoiletanolamida – conductas prototípicas.

## 2. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se realizó una investigación experimental cuantitativa acerca de la neuroprotección con Palmitoiletanolamida (PEA) en asfixia perinatal (PA), estudiando los efectos conductuales y su correlato morfológico y bioquímico en el estriado murino.

La PA es una complicación obstétrica frecuente que consiste en una interrupción temporal en el suministro de oxígeno que ocurre alrededor del nacimiento (Herrera-Marschitz et al., 2011). La prevalencia es de aproximadamente 1 a 10/1000 niños nacidos vivos (Douglas-Escobar & Weiss, 2015), con una alta tasa de mortalidad y morbilidad tanto a corto como a largo plazo. En virtud del avance científico, la mortalidad ha ido disminuyendo en las últimas décadas, y por lo tanto son mayores los casos de morbilidad (Holubiec et al., 2017). La PA constituye un factor de riesgo de parálisis cerebral, epilepsia y distintos trastornos del neurodesarrollo (Perna & Cooper, 2012).

La PA ha sido estudiada en los últimos veintiséis años utilizando un modelo experimental en ratas (Barkhuizen et al., 2017). Dicho modelo murino fue establecido por Bjelke y colaboradores (1991) e implica inducir la PA el día esperado del parto sumergiendo a la crías en un baño térmico para simular una asfixia intrauterina. Este modelo ha permitido estudiar distintas alteraciones sinápticas que permitirían explicar los trastornos del neurodesarrollo asociados a la PA (Herrera et al., 2017). Las regiones del sistema nervioso central (SNC) más vulnerables a la PA son el hipocampo, el estriado y la corteza cerebral (Grimaldi et al., 2012). En este caso se estudió el efecto de la PA sobre el estriado. Esta región cerebral, si bien tiene como funciones principales las locomotoras, también participa de las emociones y la cognición (Fitzgerald, Gruener & Mtui, 2012). De hecho, el daño provocado por la PA en el estriado ha sido asociado a patologías psíquicas como la depresión, el trastorno obsesivo-compulsivo y las adicciones, entre otros (Boksa & El-Khodir, 2003; Ferré et al., 2007). Estos trastornos podrían deberse en parte a la degeneración neuronal provocada por la PA en el estriado (Grimaldi et al., 2012). Debido a que la mayor parte de los estudios se ha centrado

en los efectos de la PA en el hipocampo, región cerebral asociada a la memoria y el aprendizaje (Barkhuizen et al., 2017), el presente trabajo se propuso ahondar en los efectos de la PA en el estriado.

Hasta el momento no existe una estrategia terapéutica eficaz para revertir o mejorar los efectos deletéreos producidos por la PA, aunque el tratamiento por hipotermia, que consiste en reducir la temperatura cerebral en el neonato, ya se utiliza en la clínica. Sin embargo, la reducción del daño cerebral resulta parcial, por lo que la búsqueda de otros agentes neuroprotectores es relevante (Blanco et al., 2011). En este sentido, la Palmitoiletanolamida (PEA) se presenta como un posible neuroprotector en casos de PA. Este lípido endógeno presente en los cerebros murino y humano ha mostrado efectos neuroprotectores en diversos modelos de injuria cerebral y neurodegeneración, como por ejemplo el reducir el daño generado por la PA en el hipocampo y sus conductas asociadas a los 30 días postnatales de la rata (Herrera, Kölliker-Frers, Barreto, Blanco & Capani, 2016; Herrera et al., 2018). Dicho punto temporal resulta relevante ya que corresponde a la edad comprendida entre los 4 y 11 años de un humano, período en el cual suelen manifestarse los trastornos del neurodesarrollo asociados a la PA (Semple, Blomgren, Gimlin, Ferriero & Noble-Haeusslein, 2013). En este sentido, el presente trabajo también se propone estudiar los efectos de la PEA en el estriado a los 30 días postnatales de ratas sometidas a PA.

Esta investigación se enmarca en el campo de la Psicobiología (Pinel, 2007) y la Psicología Comparada (Pinel, 2007; Papini, 2010) dado que no se estudian las conductas murinas por sí mismas sino en cuanto estos resultados pueden, *mutatis mutandi*, aplicarse posteriormente a los seres humanos. De hecho, este trabajo se inserta en una línea de investigación sobre neuroprotección en PA que se encuentra vigente hace más de veinticinco años (Barkhuizen et al., 2017; Herrera et al., 2017; Herrera-Marschitz et al., 2017).

Cabe destacar que se han hecho todos los esfuerzos posibles para reducir el número de animales usados y minimizar su sufrimiento, siguiendo las normas bioéticas con certificación nacional del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL, #

4091/04) ya que la institución donde se han realizado los experimentos (ININCA-UBA-CONICET) pertenece a dicha universidad, y todos los procedimientos realizados han seguido los principios de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garantía de Bienestar Animal, A-3033-01/ protocolo # S01084).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Asfixia perinatal

La PA es un síndrome clínico caracterizado por la suspensión del suministro de oxígeno que ocurre alrededor del nacimiento (Herrera-Marschitz et al., 2011). La PA puede ser causada por diferentes procesos, entre ellos la compresión del cordón umbilical, alteraciones en el intercambio de gases en la placenta y falla pulmonar del feto, produciendo falta de oxígeno (hipoxia) o de perfusión (isquemia) hacia distintos órganos del cuerpo durante el período perinatal, que, en seres humanos, empieza en la vigésimo octava semana de gestación y termina en el séptimo día post parto (Galeano, 2013).

En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), principalmente a través de la Alianza para la Salud de la Madre, el Recién Nacido y el Niño y el Plan de Acción *Todos los Recién Nacidos*, han hecho hincapié en la necesidad de realizar nuevos tratamientos e intervenciones para disminuir la mortalidad y morbilidad causada por problemas perinatales. Informan (OMS & UNICEF, 2014) que si bien en los últimos decenios, la mortalidad mundial de los menores de cinco años se ha reducido en casi un 50%, la mortalidad neonatal solamente lo hizo en un 37%. Al haberse avanzado en el tratamiento de las enfermedades infantiles, las muertes de recién nacidos representan ahora el 44% de todas las muertes de niños menores de cinco años. En todo el mundo, casi tres millones de bebés mueren durante los primeros 28 días de vida y se producen dos millones y medio de muertes fetales por año. La mayoría de las muertes de recién nacidos suceden en países de ingresos bajos y medianos. El 44% de las muertes fetales y el 73% de las muertes de recién nacidos se producen en torno al momento del trabajo del parto y el nacimiento, y en los primeros días después del nacimiento, es decir en el período perinatal. En nuestro país el porcentaje de muertes estimado en esta etapa es de 6 cada 1000, lo que daría un total de unas 4.800 muertes anuales (Grupo Interinstitucional de las Naciones Unidas sobre la Estimación de la Mortalidad en la Niñez, 2009). Más del 80% de la mortalidad neonatal se debe a

tres causas: las complicaciones de la prematuridad, las muertes perinatales relacionadas con el parto y las infecciones neonatales. Dentro de las muertes relacionadas con el parto, la causa más frecuente es la PA. La incidencia estimada de PA es de 1 cada 1000 nacimientos a término en países desarrollados y de 5 a 10 cada 1000 nacimientos a término en países en vías de desarrollo (Morales et al., 2011). Dentro de este grupo, muchos recién nacidos mueren durante el período neonatal. Entre aquellos que sobreviven, un 20-30% presentan secuelas neurológicas de corto a largo plazo, cuya gravedad depende de la extensión de la lesión, del desequilibrio metabólico durante el período de re-oxigenación y del estado de desarrollo de las regiones afectadas (Morales et al., 2011). Cuanto más inmadura se encuentra el área afectada, mayor es la interferencia del insulto con los cambios plásticos iniciales, necesarios para que se establezcan los circuitos cerebrales y la sinapsis (Herrera-Marschitz et al., 2014).

Además, la PA es factor de riesgo de bajo peso en los neonatos, y los mayores riesgos de muerte gestacional, neonatal y a lo largo de la lactancia los padecen los bebés de bajo peso al nacer o en los días subsiguientes: más del 80% de las muertes de neonatos se producen en bebés de peso inferior al esperable. Asimismo, el mayor riesgo de discapacidad se da en el primer día de vida, y un 10% de la carga mundial de discapacidad está relacionada con las afecciones neonatales. Muchas discapacidades, tanto físicas como mentales, podrían prevenirse o al menos disminuirse con una atención y tratamientos adecuados durante período perinatal (OMS & UNICEF, 2014). De aquí entonces la particular relevancia de la investigación en tratamientos neuroprotectores eficaces en casos de PA, que es factor de riesgo para numerosos trastornos mentales y neurológicos (Herrera-Marschitz et al., 2014), incluyendo discapacidad intelectual y trastornos del espectro autista (Schieve et al., 2014; Modabbernia et al., 2016), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Perna & Cooper, 2012), esquizofrenia (Pugliese et al., 2019) y trastornos neurodegenerativos (Gupta, Jadhav & Shrikhande, 2018).

### **3.2. Modelo murino de asfixia perinatal**

El modelo de PA creado por Bjelke y colaboradores (1991) es utilizado hace años en diversos laboratorios (Capani et al., 2009; Strackx et al., 2010; Morales et al., 2011; Muñiz et al., 2014, Romero et al., 2015; Saraceno et al., 2016). Las injurias producidas por la PA, estudiadas a través de este modelo, incluyen: daños neurológicos como astrogliosis; alteraciones sinápticas como la elevación del glutamato en el espacio extracelular y modificaciones en las densidades sinápticas; altos niveles de ubiquitinación y modificaciones en el citoesqueleto celular de actina (Herrera et al., 2017). Asimismo este modelo de PA reveló un desequilibrio en los sistemas dopaminérgicos y GABAérgicos, involucrados en el comportamiento motor y en otros circuitos de neurotransmisión (Bjelke, Andersson, Ögren & Bolme, 1991) en estrecha vinculación con el estriado, región cerebral estudiada en la presente investigación. También este modelo de PA ha resultado adecuado para la investigación de los orígenes de la esquizofrenia y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad en el neurodesarrollo (Barkhuizen, 2007).

Este modelo de asfixia se ha utilizado para analizar los efectos de la PA en distintas regiones del SNC. Ha permitido estudiar diferentes alteraciones sinápticas producto de la PA (Herrera et al., 2017) y exhibe algunas ventajas remarcables tales como: (a) la PA es producida al momento del nacimiento, reproduciendo de manera más precisa algunas situaciones clínicas prevalentes como la circular de cordón (Capani et al., 2009); (b) acidosis, hipercapnia e hipoxia están presentes en el cuerpo entero, reproduciendo una asfixia global, que es el tipo más común (Strackx et al., 2010); (c) no es invasivo quirúrgicamente; (d) el hecho de que la asfixia sea producida en el cuerpo entero, afectando ambos hemisferios cerebrales y las estructuras profundas del cerebro, hace que el modelo sea adecuado para estudios conductuales, ya que las ratas tienen lateralizadas las funciones cerebrales (Arteni et al., 2010); (e) ha evidenciado sólidas consecuencias conductuales, como alteraciones en la coordinación motora (Simola et al., 2009), la memoria de trabajo (Galeano et al., 2011; Morales et al., 2011), la memoria episódica (Blanco et al., 2015), la memoria de referencia

espacial (Galeano et al., 2011; Blanco et al., 2015), la actividad exploratoria (Galeano et al., 2011) y altos niveles de ansiedad (Morales et al., 2011). Este modelo se ha mostrado asimismo eficaz para estudiar no sólo las consecuencias a corto y mediano plazo de la PA sino también a largo plazo, resultando la injuria un factor de riesgo para demencias como la de tipo Alzheimer (Barkhuizen, 2007).

### **3.3. Estriado**

El estriado es una zona subcortical ubicada en ambos hemisferios cerebrales delante del tálamo, bajo los ventrículos cerebrales, y es el principal componente de los ganglios basales. Está formado por las siguientes partes: el núcleo caudado, el núcleo accumbens y el putamen, el cual a su vez forma parte del núcleo lenticular (Chade, 2008; Fitzgerald et al., 2012). Es posible encontrar al menos cuatro circuitos que empiezan en la corteza cerebral, atraviesan los ganglios basales y regresan a la corteza (Fitzgerald et al., 2012):

- El asa motora, que incluye la parte posterior del estriado, se ocupa de los movimientos aprendidos así como de la inhibición de los movimientos. Está relacionada con la memoria procedimental y de trabajo. Intervienen en estos circuitos los neurotransmisores dopaminérgicos, GABAérgicos y glutaminérgicos, principalmente. Su alteración produce trastornos tales como las enfermedades de Parkinson y Huntington, el Trastorno Obsesivo-Compulsivo, entre otras.
- El asa cognitiva, cuyo principal componente es el núcleo caudado, participa en el aprendizaje motor y en la planificación futura en general, pero especialmente en lo relativo a las intenciones motoras complejas y las tareas ejecutadas automáticamente. También influye en la atención focalizada.
- El asa límbica, que atraviesa la parte extremo anterior y ventral del estriado, donde se encuentra el núcleo accumbens, está implicada en la expresión de las emociones. Posee numerosas terminaciones dopaminérgicas, que median el aprendizaje y la conducta motivada,

y su injuria puede provocar la falta de expresiones emocionales faciales y ausencia de gestos espontáneos. Asimismo influye en la motivación, los comportamientos adictivos, la agresividad y la planificación de la conducta. Luego de varios años de daño agudo, puede producir demencia y conductas psicopáticas.

- El asa oculomotora, principalmente presente en el núcleo caudado, con mayoría de neurotransmisión GABAérgica, controla las sacudidas oculares voluntarias y automáticas.

El estriado recibe proyecciones principalmente desde distintas regiones de la corteza cerebral (vía córtico-estriatal), las cuales son excitatorias, realizadas principalmente a través del neurotransmisor glutamato, que actúa sobre las neuronas del estriado, en su mayoría espinosas intermedias.

El putamen recibe aferencias de la corteza motora, mientras que el caudado recibe aferencias corticales vinculadas con diversas funciones cognitivas. A su vez, las neuronas del putamen y el caudado son la vía eferente hacia el globo pálido (vía estriato-palidal) y la sustancia nigra (vía estriato-nigral), las cuales se conectan con el tálamo y de allí nuevamente con la corteza cerebral. Este circuito se produce a través de dos vías, que actúan paralelamente (Kandel, Schwartz & Jessel, 2001):

- Vía directa: Comienza en la corteza cerebral, luego se proyecta hacia el estriado, de allí al globo pálido interno, y a continuación hacia el tálamo, para regresar entonces hacia la corteza. Su función es excitatoria, y es necesaria para diversas conductas tanto motoras como emocionales y cognitivas.
- Vía indirecta: Inicia en la corteza, a continuación se proyecta al cuerpo estriado, luego al área externa del globo pálido y el núcleo subtalámico, y regresa al área interna del globo pálido, para proyectarse hacia el tálamo y alcanzar finalmente la corteza cerebral, con una función inhibitoria, refrenando conductas motoras, emocionales y cognitivas.

Por lo tanto el papel del estriado en relación con la corteza cerebral es esencial ya que, a través de sus vías excitatorias e inhibitorias, es responsable de múltiples comportamientos, y su injuria ocasiona patologías hipo e hiperkinéticas, trastornos en la memoria, la motivación, la atención y el razonamiento, entre otros (Rodríguez-Oroz et al., 2007).

El estriado es una de las zonas más vulnerables a la PA, cuyos efectos en esta área cerebral incluyen degeneración neuronal y astrogliosis. La degeneración neuronal se evidencia en: altos niveles de ubiquitinación, es decir, marcación de proteínas que serán degradadas, alteraciones en el citoesqueleto de la neurona y en su organización dendrítica. Esta degeneración se observa principalmente en neuronas GABAérgicas. La astrogliosis acompaña este proceso y consiste en un aumento excesivo en la cantidad de astrocitos como consecuencia de la injuria cerebral (Muñiz et al., 2014).

### **3.4. Neuroprotección**

La lesión cerebral posee varias fases: primero, e inmediatamente después de la injuria, se encuentra la fase primaria, en la cual muere un gran número de neuronas por necrosis celular, lo cual resulta irreversible. Luego, en la etapa llamada latente, se produce una recuperación parcial del metabolismo oxidativo del cerebro. Sin embargo, después de este proceso, el metabolismo puede deteriorarse nuevamente, siendo la fase de fracaso energético secundario, y es en esta en la cual se vuelve a llevar a cabo la muerte neuronal por necrosis y apoptosis. Esto es lo que se conoce como lesión secundaria (Blanco et al., 2011), la cual puede prevenirse durante la fase latente, que ofrece una ventana terapéutica, cuya duración en animales es de entre 6 y 15 horas. Es en este lapso durante el cual se podría intervenir aplicando agentes neuroprotectores, que aún se encuentran en fase de experimentación animal (Blanco et al., 2011). Esta fase forma parte de la Investigación Traslacional, que es la investigación aplicada a través de la cual se busca traducir el conocimiento científico disponible de modo que resulte útil para la población general, maximizando sus beneficios. Esta búsqueda de transferir el conocimiento empírico a la realidad, posee diversas

etapas, entre las cuales se encuentran la experimentación animal y los ensayos clínicos para desarrollar potenciales nuevos tratamientos, evaluando su eficacia y seguridad en primer lugar a través de experimentos controlados en animales (Cabieses & Espinoza, 2011). Es en esta fase en la que se inserta la presente investigación, buscando posibles agentes neuroprotectores para la PA, utilizando un modelo murino que, por las ventajas antes mencionadas, es particularmente adecuado para posteriormente poder realizar el pasaje de la investigación a la clínica.

La neuroprotección constituye entonces una alternativa terapéutica que apunta a prevenir la lesión cerebral secundaria, ayudando a sobrevivir a neuronas que, de no recibir este tratamiento, morirían (Blanco et al., 2011). Hasta la actualidad, no existe ningún tratamiento eficaz para la PA, utilizándose en la clínica la hipotermia terapéutica como tratamiento neuroprotector, que consiste en la reducción de la temperatura cerebral del neonato en 3-4°C durante al menos 72 horas, como modo de aminorar las secuelas de la PA. Sin embargo, su eficacia es parcial y resulta sumamente costosa, lo cual es un importante obstáculo teniendo en cuenta que los países con más alta incidencia de PA son los que se encuentran en vías de desarrollo (Morales et al., 2011). Por este motivo, resulta relevante la investigación sobre posibles agentes neuroprotectores coadyuvantes de la hipotermia terapéutica (Cilio & Ferriero, 2010).

### **3.5. Palmitoiletanolamida (PEA)**

La PEA, derivada de la reacción entre el ácido palmítico y la etanolamida, es sintetizada e hidrolizada por la microglía (Muccioli & Stella, 2008) y pertenece a la familia de las aciletanolamidas, las cuales son mediadores lipídicos endógenos presentes en los cerebros humano y murino (Guida et al., 2017). Las aciletanolamidas poseen propiedades protectoras y homeostáticas endógenas frente al daño cerebral, regulando los procesos de inflamación que resultan perjudiciales para el tejido nervioso (Esposito & Cuzzocrea, 2013). Ahora bien, esta respuesta endógena de las aciletanolamidas parecería no ser suficiente, razón por la cual se han estudiado sus propiedades neuroprotectoras exógenas,

es decir, al ser administrada como droga. El tratamiento con PEA ha evidenciado las mencionadas propiedades en mayor medida que otras aciletanolamidas, al ser administrada de manera exógena en diversos modelos de injuria cerebral y neurodegeneración (Herrera et al., 2016). Asimismo se observó un efecto neuroprotector del tratamiento con aciletanolamidas, específicamente con PEA, luego de la PA. Estos resultados fueron encontrados en el hipocampo (Herrera et al., 2018). En cambio, en el presente trabajo se busca estudiar sus efectos en el estriado.

### **3.6. Psicología Comparada**

La Psicología Comparada es un área interdisciplinaria que surgió a fines del siglo XIX, de la unión entre la Psicología Experimental y la Biología, en particular luego de los desarrollos de las teorías evolucionistas, que permitieron realizar mayores comparaciones entre las distintas especies animales, incluido el ser humano (Papini, 2010). Es una rama de la Psicobiología, disciplina que busca estudiar la biología de la conducta, teniendo en cuenta los aportes de la Neuroanatomía, la Neurofisiología, la Neuropatología y la Neurofarmacología, entre otras ciencias (Pinel, 2007).

Si bien a menudo se la ha confundido con la Etología, la Psicología Comparada, a diferencia de aquella, se centra principalmente en el estudio de mamíferos a través de una metodología de trabajo de laboratorio, ya que su objetivo no es el análisis del comportamiento animal por sí mismo, como sucede en la Etología, sino la realización de comparaciones entre el animal estudiado y el ser humano, buscando en última instancia una mejor comprensión de la persona humana (Fernández Ríos, 1987). En este sentido, la utilización de modelos animales de laboratorio permite investigar de manera más sencilla, ya que se pueden controlar todas las variables, dado que el comportamiento animal es más simple que el humano y además se trabaja en laboratorios, con un menor costo económico y pudiendo llevarse a cabo procedimientos que, por motivos éticos, no podrían realizarse en seres humanos (Domjan, 2010), como sucede en el caso de la PA.

Teniendo en cuenta que la Psicología Comparada busca realizar extrapolaciones y/o generalizaciones de la psicología animal a la psicología humana, no se deben olvidar las necesarias precauciones para que esto se lleve a cabo adecuadamente (Chudasama & Robbins, 2006; Ardila, 2007). En este sentido, se toma como referencia el estudio de Semple y colaboradores (2013), en el cual se realiza un paralelo entre el desarrollo cerebral murino y humano, manifestando que los hitos madurativos del cerebro son similares en ambas especies, y pudiendo por lo tanto mostrar la equivalencia entre los 30 días postnatales de la rata y la edad comprendida entre los 4 y 11 años de un ser humano (Semple et al., 2013), período durante el cual suelen hacerse manifiestos los trastornos del neurodesarrollo asociados a la PA (Herrera-Marschitz et al., 2017). Es por esta razón que se ha tomado dicho punto temporal para realizar las pruebas.

Al existir grandes semejanzas entre el cerebro humano y el de la rata, y además tratarse de un animal mamífero, su modo de parto y posibilidad de PA es similar al humano. El modelo utilizado (Bjelke et al., 1991) ha demostrado ser efectivo para reproducir una situación de PA durante más de 25 años de investigación (Barkhuizen et al., 2017; Herrera et al., 2017; Herrera-Marschitz et al., 2017), permitiendo analizar sus consecuencias tanto a nivel conductual como morfológico y bioquímico.

## **4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **4.1. Objetivos**

*Objetivo general:*

Estudiar el potencial efecto neuroprotector de la PEA en el estriado de ratas de 30 días sometidas a PA, a nivel conductual, morfológico y bioquímico.

*Objetivos específicos:*

1. Analizar los efectos de la PA a los 30 días en el estriado murino a nivel conductual, morfológico y bioquímico.
2. Evaluar las consecuencias del tratamiento con PEA en ratas de 30 días que han sufrido PA, a nivel conductual, morfológico y bioquímico, y su posible correlato con el ser humano.

### **4.2. Hipótesis**

1. La PA causa injurias en el estriado murino y sus conductas asociadas, a los 30 días postnatales.
2. La PEA posee un efecto neuroprotector en el estriado, en la injuria ocasionada por la PA en los 30 días postnatales.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Animales de laboratorio**

Fueron adquiridas 20 ratas preñadas del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, de la cepa *Sprague Dawley*. En este modelo de neuroprotección sólo las crías macho han sido utilizadas ya que el estrógeno presenta propiedades neuroprotectoras y constituye una variable extraña (Saraceno et al., 2010).

Los animales se mantuvieron a  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $65\pm 5\%$  de humedad con acceso libre a alimentos y agua, en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 hs. (luces desde las 7:00 am). Cada rata se usó solo una vez y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar su sufrimiento y para reducir el número de animales utilizados. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garantía de Bienestar Animal, A-3033-01/protocolo #S01084) y siguiendo las normas bioéticas con certificación nacional del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL)

El número total de ratas utilizadas fue de 63 crías macho, divididas en cuatro grupos: ratas nacidas por parto natural inyectadas con vehículo (grupo control+vehículo, n=13), ratas sometidas a PA e inyectadas con vehículo (grupo PA+vehículo, n=15), ratas nacidas por parto natural inyectadas con PEA (grupo control+PEA, n= 18) y ratas sometidas a PA e inyectadas con PEA (grupo PA+PEA, n=17). No se utilizaron animales controles nacidos por cesárea ya que investigaciones previas revelaron que estos no presentan diferencias significativas con respecto a los animales controles nacidos por vía vaginal (Galeano et al., 2011; Blanco et al., 2015; Herrera et al., 2018).

### **5.2. Definición de variables**

El diseño del presente trabajo de investigación es experimental cuantitativo.

Las variables independientes son: nacimiento y tratamiento. El nacimiento presenta dos condiciones posibles: parto natural (control) o PA. El tratamiento

presenta dos condiciones posibles: tratamiento con vehículo (solución fisiológica) o tratamiento con PEA (disuelto en vehículo).

Las variables dependientes refieren a los efectos conductuales, morfológicos y moleculares, cuya medición será explicitada a continuación.

### **5.3. Instrumentos de recolección de datos**

#### ***5.3.1. Instrumentos para las pruebas de conducta***

##### *Laberinto elevado en cruz*

El instrumento consiste en un laberinto negro de melamina conformado por una plataforma central cuadrada (11 x 11 cm.) de la cual surgen cuatro brazos: dos brazos cerrados (50 x 11 x 40 cm.) y dos brazos abiertos (50 x 11 x 0,25 cm.), formando un laberinto en forma de cruz, elevado a una altura de 100 cm. sobre el nivel del piso (Galeano et al., 2015). Las sesiones de prueba se grabaron usando una cámara digital Sony HDR-AS100V.

##### *Campo Abierto*

El instrumento consiste en un cuadrado de melamina negra (60x60x40 cm.) rodeado por paredes de 40 cm. de alto (Galeano et al., 2015). Las sesiones de prueba se grabaron usando una cámara digital Sony HDR-AS100V.

#### ***5.3.2. Instrumentos para el análisis morfológico***

Se utilizó anestesia, un equipo de perfusión, un vibrátomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), anticuerpos y marcadores para la técnica inmunohistoquímica y un microscopio óptico Leica.

#### ***5.3.3. Instrumentos para el análisis molecular***

Se utilizó una guillotina, elementos para la homogeneización y disección cerebral, bandas inmunorreactivas y marcadores para la técnica Western Blot.

#### **5.3.4. Software de conducta**

Se utilizó el programa *ANY-Maze* (versión 5.29).

#### **5.3.5. Software de análisis de imágenes**

Se utilizó el programa *ImageJ* (versión 1.41o.)

#### **5.3.6. Software estadístico**

Se utilizó el programa *Graph pad Prism* (versión 5).

### **5.4. Procedimiento**

Se utilizó el modelo experimental diseñado por Bjelke y colaboradores (1991), según el cual cuando las ratas preñadas paren su primera cría, a la rata madre se le realiza una eutanasia y sus cuernos uterinos se sumergen en agua a 37°C por 19 minutos, produciéndose entonces una asfixia severa. Luego, se retiran las crías de dentro de los cuernos y se las estimula manualmente hasta que su respiración sea normal. Finalmente, se las coloca cerca de una lámpara encendida para que recuperen el calor (Barkhuizen et al., 2017).

El tratamiento respectivo (vehículo o PEA) fue administrado en la primera hora de vida por medio de una inyección subcutánea. La dosis utilizada fue de 10 mg/kg. La dosis de 10 mg/kg de PEA (0879/10, Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra) ha mostrado resultados efectivos como neuroprotector en numerosos modelos de injuria cerebral y neurodegeneración (Herrera et al., 2016).

Luego, las ratas fueron colocadas en jaulas con una madre sustituta que había parido en las últimas 24 horas. Después del destete, se colocaron entre tres y cuatro animales por jaula, de diferentes grupos experimentales, para poder descartar variables extrañas provenientes de que los animales no hayan tenido la misma madre o ambiente.

#### **5.4.1. Procedimiento de recolección de datos**

##### *Pruebas de conducta*

En el día postnatal 30, todas las ratas fueron sometidas a pruebas de conducta en una habitación aislada, entre las 8 y las 17 horas. Los instrumentos fueron limpiados con etanol luego de cada prueba para minimizar los estímulos olfativos. Durante las pruebas, se reprodujo sonido blanco (Galeano et al., 2015) y antes de las mismas se dejó aclimatar al animal al nuevo ambiente durante cinco minutos (Molina, Capani & Guelman, 2016). De esta manera se controlaron variables extrañas.

Las pruebas administradas fueron:

- *Laberinto elevado en cruz*: Se ubicó a la rata en la plataforma central, frente a un brazo abierto. Se la dejó explorar libremente durante 5 minutos y luego se la regresó a la jaula. Se consideró que la rata entraba en un brazo del laberinto cuando se encontraba con sus cuatro patas adentro (Galeano et al., 2015). Se midió la distancia total recorrida y el tiempo transcurrido en brazos cerrados. Las ratas que se cayeron del laberinto fueron excluidas del estudio. Se evaluaron las conductas de *rearing*, exploración, y *grooming*, acicalamiento. Esta prueba se aplica para evaluar actividad exploratoria y niveles de ansiedad (Wall & Messier, 2001).
- *Campo Abierto*: Las ratas fueron colocadas en el centro del aparato y se les permitió explorarlo por 5 minutos (Molina et al., 2016). Se cuantificó la distancia total recorrida y el número de líneas cruzadas, así como las conductas prototípicas de *rearing* y *grooming*. Esta prueba se utiliza para examinar la locomoción, la actividad exploratoria y los cambios emocionales inducidos por la exposición a un medio novedoso (Molina et al., 2016).

Las variables conductuales fueron registradas *a posteriori* por dos observadores ciegos, previamente entrenados, y el tiempo fue cuantificado utilizando la función correspondiente del programa *ANY-maze*.

### *Inmunohistoquímica*

El análisis a través de esta técnica se realizó utilizando cuatro animales por tratamiento y fue repetido cuatro veces para cada cerebro murino. En el día postnatal 30, a cuatro de las ratas (una por grupo), se les realizó una perfusión intracardiaca para fijar el tejido (Saraceno et al., 2016). Una vez fijado el animal, se le extrajo el cerebro y se realizaron cortes de distintas secciones del estriado. Se obtuvieron imágenes a través de un microscopio óptico para poder realizar un análisis morfológico, es decir, estudiar cómo se distribuyen determinados marcadores en el tejido cerebral. Se utilizaron los siguientes marcadores de daño neuronal y respuesta glial: neurofilamentos fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M), proteínas asociadas a los microtúbulos 2 (MAP-2) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Los animales fueron anestesiados con ketamina 40 mg/kg y xilazina 5 mg/kg, por vía intraperitoneal, y se perfundieron intracardialmente con paraformaldehído al 4% en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4). Inmediatamente, sus cerebros se retiraron y se fijaron posteriormente en la misma solución fijadora durante dos horas a temperatura ambiente, y luego se sumergieron durante la noche a 4°C en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4). Se obtuvieron secciones del estriado (50 µm) utilizando un vibrátomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

La inmunohistoquímica se realizó en secciones de flotación libre con agitación moderada. Antes de la tinción, las secciones se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos para anular las peroxidasas endógenas. Después de tres etapas de lavado en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4), se bloquearon los sitios de unión a anticuerpos no específicos utilizando un suero de cabra normal al 0,3%. Las secciones de flotación libre se incubaron durante la noche a 4°C con anti-MAP-2 (1:250, IgG policlonal de conejo; ab32454, Abcam, Cambridge, Inglaterra), anti-pNF-H/M que reconoce las repeticiones KSP (proteína kinesina del huso) de la forma fosforilada, (1:500, IgG monoclonal de ratón; MAB1592, Millipore, Burlington, EE.UU.) o anti-GFAP (1:200, IgG monoclonal de conejo; Cell-Marque, Sigma-Aldrich Company, Código EP672Y). Después de

varios lavados, las secciones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (anti-IgG de ratón biotinilada, 1:500, BA9200 o anti-IgG de conejo biotinilada, 1:500, BA-1000, Vector, Burlingame, EE.UU.). El sistema de detección de estreptavidina/HRP (1:500, K0609, Dako, Santa Clara, EE.UU.) se utilizó para la tinción de antígenos según las recomendaciones del fabricante. Las secciones se incubaron con el sustrato diaminobencidina (D3939, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, EE.UU.) durante dos minutos a temperatura ambiente.

Se obtuvieron imágenes microscópicas utilizando un microscopio óptico Leica. Se calculó el porcentaje de área reactiva para pNF-H/M y MAP-2 utilizando el programa *ImageJ* (versión 1.41o.) y el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP se estimó manualmente.

### *Western Blot*

El análisis a través de esta técnica se realizó utilizando cuatro animales por tratamiento y fue repetido cuatro veces para cada cerebro murino. Los cerebros de los animales (el estriado) fueron disecados y homogeneizados, para poder realizar el análisis bioquímico y cuantificar la expresión de marcadores de daño neuronal y respuesta glial.

Los animales fueron sometidos a eutanasia por decapitación, sus cerebros se diseccionaron y se homogeneizaron en *buffer* de lisis congelado (que contenía Tris/HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Triton X-100 al 0,1% e inhibidores de proteasa). Los tejidos se descongelaron en hielo y se centrifugaron a 14000 rpm durante quince minutos a 4°C. La concentración de proteínas de cada muestra se analizó utilizando una solución de Bradford (500-0201, Bio-Rad, Richmond CA, EE.UU.) y albúmina de suero bovino. Se diluyeron 80 µg de proteína total en *buffer* de muestra (tris/HCl 0,3 M, pH 7, glicerol al 5%, SDS al 5%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0,1%) y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las membranas de difluoruro de polivinilideno que contienen proteínas transferidas se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% y BSA al 1% en solución salina con *buffer*

Tris que contenía Tween 20 al 0,05%. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-MAP-2 (1:1000, IgG policlonal de conejo; ab32454, Abcam, Cambridge, Inglaterra), anti-pNF-H/M (1:500, IgG monoclonal de ratón; MAB1592, Millipore, Burlington, EE.UU.) o anti-GFAP (1:1,000, IgG monoclonal de ratón; SC-33673, Biotecnología Santa Cruz), y anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (1:3000, IgG de conejo, G9545, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, EE.UU.) como carga control. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de conejo y ratón (1:3000, 170-6515 y 170-6516 respectivamente, Bio-Rad, Richmond CA, EE.UU.) durante una hora a temperatura ambiente.

Las bandas inmunorreactivas se detectaron utilizando un sistema de análisis de Western Blot ECL (Clarity Western ECL, 1705061, Bio-Rad, Richmond CA, EE.UU.). Las películas se escanearon y la densidad óptica de las bandas de proteínas se cuantificó utilizando el Analizador Gel-Pro 3.1.00.00 (Media Cybernetics).

#### **5.4.2. Procedimiento de análisis de datos**

Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SEM, es decir teniendo en cuenta el error estándar de la media, para conocer la precisión de la misma. La distribución normal y la homogeneidad de varianzas se verificaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA), utilizando el tipo de nacimiento (control o asfíctico) y el tipo de tratamiento (vehículo o PEA) como factores centrales, así como su interacción. Se utilizaron los análisis post hoc Tukey o Bonferroni, según lo recomendado en cada caso por el software estadístico utilizado (*Graph Pad Prism 5*). Se consideraron significativas las diferencias con una probabilidad igual o menor al 5%.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efectos conductuales en el día postnatal 30

Los resultados estadísticos evidencian que ni la locomoción ni la actividad en general fueron afectadas por la PA en el día postnatal 30. En cuanto al número de líneas cruzadas en la prueba Campo Abierto, el ANOVA de dos vías informó que ni la condición de nacimiento ( $F_{(1,50)}=1.93$ ,  $p=0.1716$ ) ni el tratamiento recibido ( $F_{(1,50)}=0.6706$ ,  $p=0.4172$ ) han influido significativamente. Tampoco fueron significativos la condición de nacimiento y el tratamiento en cuanto al tiempo que los animales pasaron en los brazos cerrados en la prueba Laberinto elevado en cruz ( $F_{(1,54)}=0.03662$ ,  $p=0.8493$ ;  $F_{(1,54)}=3.624$ ,  $p=0.0646$ , respectivamente). Asimismo, la condición de nacimiento y el tratamiento no fueron significativos en la distancia total recorrida en Campo Abierto ( $F_{(1,50)}=0.8553$ ,  $p=0.3592$ ;  $F_{(1,50)}=0.005146$ ,  $p=0.9431$ , respectivamente) ni en la prueba del Laberinto elevado en cruz ( $F_{(1,32)}=0.1234$ ,  $p=0.7272$ ;  $F_{(1,32)}=2.645$ ,  $p=0.1119$ , respectivamente) (Herrera, 2019).

Por el contrario, la conducta de *rearing* (exploración vertical), un comportamiento prototípico en las ratas, se vio alterada en el día postnatal 30 como consecuencia de la PA, según se puede deducir de los resultados. Con respecto al tiempo dedicado a esta conducta en la prueba Campo Abierto, el ANOVA de dos vías señaló que la condición de nacimiento y el tratamiento influyeron significativamente en este comportamiento ( $F_{(1,54)}=5.51$ ,  $p=0.0226$ ;  $F_{(1,54)}=5.779$ ,  $p=0.0197$ , respectivamente). Sin embargo, la interacción entre estos dos factores no resultó significativa ( $F_{(1,54)}=2.888$ ,  $p=0.095$ ). El análisis post hoc indicó que las ratas asfícticas tratadas con vehículo mostraron una disminución significativa en el tiempo dedicado al *rearing* en relación con el grupo control tratado con vehículo ( $p=0,04$ ). Esta alteración del comportamiento se invirtió en los animales asfícticos tratados con PEA ( $p=0,009$ ), los cuales no presentaron diferencias significativas con respecto a los controles ( $p=0,06$ , Figura 1A). Se encontraron resultados similares en la prueba Laberinto elevado en cruz en cuanto al tiempo dedicado al *rearing*. En esa prueba, tanto la condición de nacimiento

como el tratamiento fueron variables significativas ( $F_{(1,36)}=41.26$ ,  $p<0.0001$ ;  $F_{(1,36)}=10.69$ ,  $p=0.0024$ , respectivamente), y su interacción también lo fue ( $F_{(1,36)}=11.67$ ,  $p=0.0016$ ). El análisis post hoc señaló una reducción significativa en el tiempo dedicado a la conducta de *rearing* como consecuencia de la PA ( $p=0.0009$ ), lo cual se revirtió después del tratamiento con PEA ( $p=0.0009$ ). Los animales asfícticos tratados con PEA no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles ( $p=0.0643$ , Figura 2A). Tanto en la prueba Campo Abierto como en el Laberinto elevado en cruz, el tratamiento con PEA en el grupo control no tuvo un efecto significativo sobre el tiempo dedicado al *rearing* en relación con las ratas control tratadas con vehículo ( $p=0.0628$ ;  $p=0.0619$ , respectivamente; Figuras 1A y 2A, respectivamente) (Herrera, 2019).

Aunque las variables de tratamiento y nacimiento no resultaron significativas con respecto al tiempo que pasaron las ratas en los brazos abiertos de la prueba Laberinto elevado en cruz ( $F_{(1,54)}=3.203$ ,  $p=0.0813$ ;  $F_{(1,54)}=1.189$ ,  $p=0.2819$ ), se analizó también otro comportamiento relacionado con la ansiedad: el *grooming*, conducta de acicalamiento prototípica en ratas. En cuanto al tiempo dedicado a esta conducta en la prueba Campo Abierto, las condiciones de nacimiento y el tratamiento influyeron significativamente ( $F_{(1,59)}=6.015$ ,  $p=0.0172$ ;  $F_{(1,59)}=16.64$ ,  $p=0.0001$ , respectivamente), pero su interacción no resultó significativa ( $F_{(1,59)}=3.405$ ,  $p=0.8767$ ). El análisis post hoc señaló que el tiempo dedicado al *grooming* aumentó en forma significativa como resultado de la PA ( $p=0.04$ ), lo cual pudo revertirse después del tratamiento con PEA ( $p=0.0009$ ). El grupo asfíctico tratado con PEA presentó diferencias significativas con respecto a los animales controles ( $p=0.06$ , Figura 4B). El tiempo dedicado al *grooming* en el Laberinto elevado en cruz también se alteró como consecuencia de la PA, pero el tratamiento con PEA no revirtió los valores en esta ocasión. La condición de nacimiento resultó significativa ( $F_{(1,32)}=14.15$ ,  $p=0.0007$ ), pero no así la variable de tipo de tratamiento ( $F_{(1,32)}=0.0001$ ,  $p=0.9906$ ) como tampoco la interacción entre ambos ( $F_{(1,32)}=0.02445$ ,  $p=0.8767$ ). El análisis post hoc reveló que el tiempo dedicado al *grooming* aumentó significativamente en los animales asfícticos inyectados con vehículo en relación con los controles tratados con vehículo

( $p=0.0412$ ), pero esto no se invirtió en el grupo asfíctico tratado con PEA ( $P=0.0645$ ), el cual presentó diferencias significativas con los controles ( $p=0.0389$ , Figura 5B). En las pruebas Campo Abierto y Laberinto elevado en cruz, el tratamiento con PEA en las ratas control no tuvo un efecto significativo sobre el tiempo dedicado al *grooming* en comparación con las ratas control inyectadas con vehículo ( $p=0.0641$ ;  $p=0.0623$ , respectivamente; Figuras 1B y 2B, respectivamente) (Herrera, 2019).

Figura 1. Tiempo dedicado a las conductas de *rearing* y *grooming* en la prueba Campo Abierto, en el día postnatal 30.

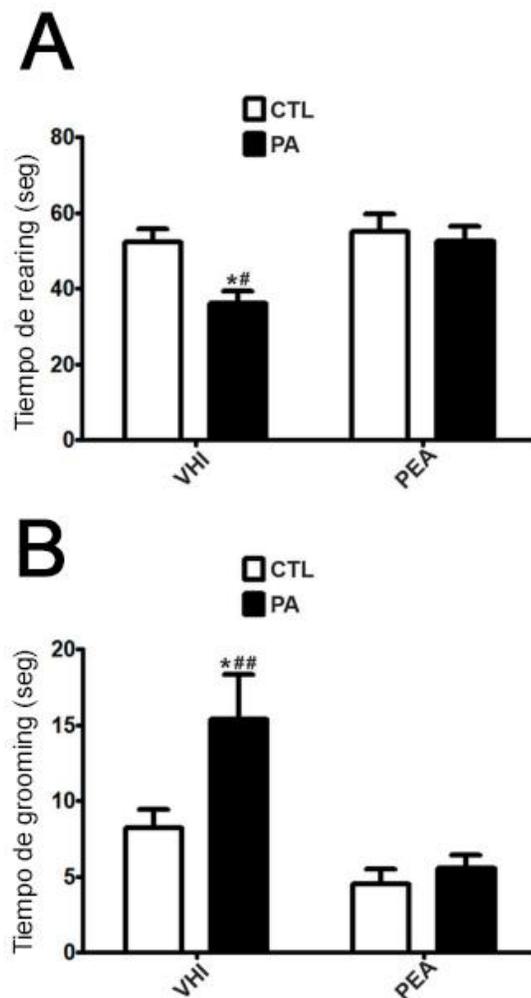


Figura 1 (Modificada de Herrera, 2019): (A) Tiempo dedicado al *rearing*, cuantificado en segundos, en cada grupo experimental. (B) Tiempo dedicado al *grooming*, cuantificado en segundos, en cada

grupo experimental. Las barras y las barras de error representan la media  $\pm$ SEM calculada a través de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de pruebas post hoc de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ , PA-VHI frente a CTL-VHI; #  $p < 0.01$  y ##  $p < 0.001$ , PA-VHI frente a PA+PEA. CTL-VHI: grupo control tratado con vehículo; PA-VHI: grupo sometido a PA y tratado con vehículo; PA+PEA: grupo sometido a PA y tratado con PEA; CTL+PEA: grupo control tratado con PEA.

Figura 2: Tiempo dedicado a las conductas de *rearing* y *grooming* en la prueba Laberinto elevado en cruz, en el día postnatal 30.

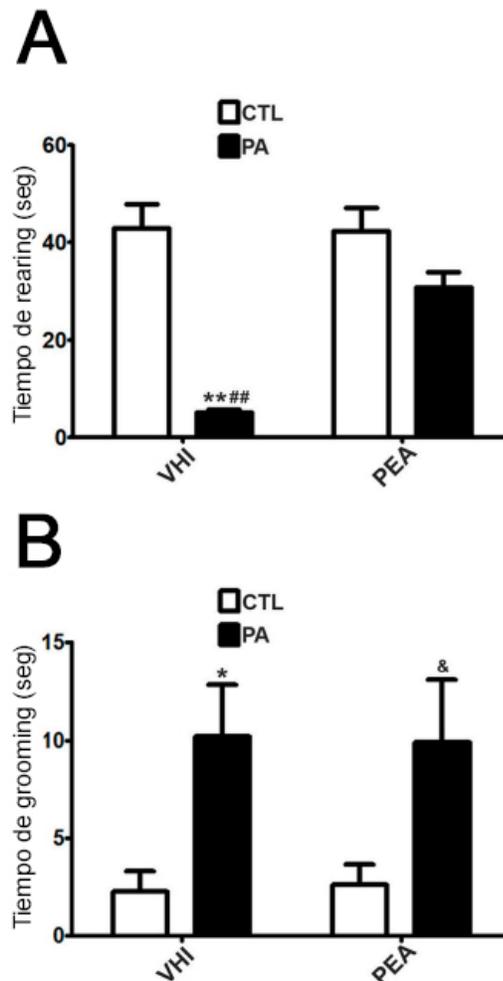


Figura 2 (Modificada de Herrera, 2019): **(A)** Tiempo dedicado al *rearing*, cuantificado en segundos, en cada grupo experimental. **(B)** Tiempo dedicado al *grooming*, cuantificado en segundos, en cada grupo experimental. Las barras y las barras de error representan la media  $\pm$ SEM calculada a través del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguidas de pruebas post hoc de Bonferroni. \*  $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ , PA-VHI frente a CTL-VHI; ##  $p < 0.001$ , PA-VHI frente a PA+PEA; &  $p < 0.05$ ,

PA+PEA frente a CTL-VHI. CTL-VHI: grupo control tratado con vehículo; PA-VHI: grupo sometido a PA y tratado con vehículo; PA+PEA: grupo sometido a PA y tratado con PEA; CTL+PEA: grupo control tratado con PEA.

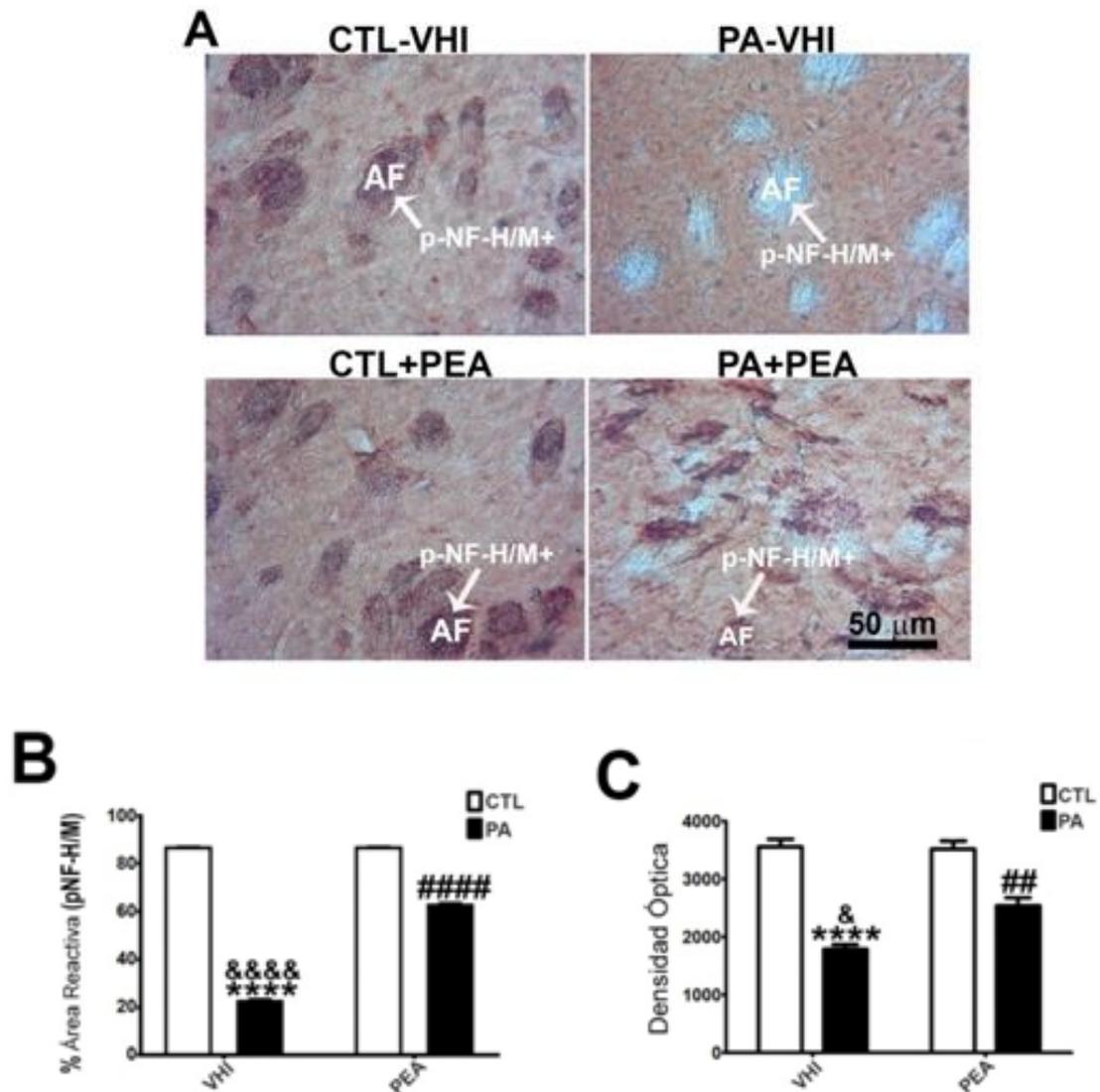
## 6.2. Efectos morfológicos y bioquímicos en el día postnatal 30

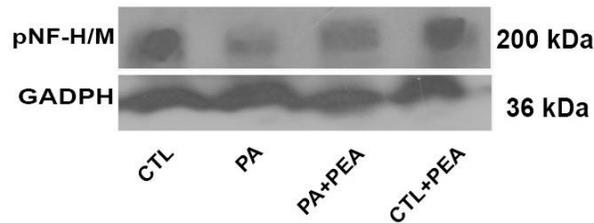
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a nivel conductual, se estudiaron sus correlatos neurobiológicos a través del análisis de los siguientes biomarcadores de daño neuronal y respuesta glial: neurofilamentos fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M), proteínas asociadas a los microtúbulos 2 (MAP-2) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Udovin et al., 2020).

Se analizó mediante inmunotinción en el estriado murino en el día postnatal 30, la fosforilación de pNF-H/M, como medida de la disfunción axonal y la degeneración celular. La figura 3A muestra un ejemplo representativo de la sección estriatal obtenida por tinción inmunohistoquímica para pNF-H/M y se pueden observar cambios morfológicos como consecuencia de la PA. El ANOVA de dos vías reveló que los principales factores: condiciones de nacimiento y tratamiento, fueron significativos, al analizar el porcentaje de área reactiva para pNF-H/M ( $F_{(1,8)}=74552$ ,  $p<0,0001$ ;  $F_{(1,8)}=15608$ ,  $p<0,0001$ , respectivamente), y su interacción también fue significativa ( $F_{(1,8)}=15639$ ,  $p<0,0001$ ). El análisis post-hoc indicó que el área reactiva para pNF-H/M mostró una reducción significativa como consecuencia de la PA ( $p<0,0001$ , Figura 3B) y que esta disminución se atenuó significativamente por el tratamiento con PEA pero no pudo alcanzar el estado del grupo control ( $p<0,0001$ , Figura 3B). Consistentemente, la expresión de proteínas para pNF-H/M en el estriado de la rata dependía de la condición de nacimiento y el tratamiento recibido ( $F_{(1,8)}=122.3$ ,  $p<0.0001$ ;  $F_{(1,8)}=8.002$ ,  $p=0.0222$ , respectivamente). La interacción entre el tratamiento y la condición de nacimiento también fue significativa ( $F_{(1,8)}=10.18$ ,  $p=0.0128$ ). El análisis post-hoc confirmó una reducción en la expresión de la proteína pNF-H/M en el grupo de PA con vehículo ( $p<0,0001$ ), que se atenuó después del tratamiento con PEA ( $p=0,0119$ , Figura 3C), aunque sin una reversión total al estado del grupo control ( $p=0,0024$ , Figura 3C). El tratamiento con PEA en las ratas del grupo control no tuvo un efecto

significativo en el área reactiva y los niveles de proteína para pNF-H/M, presentando valores similares al grupo de control inyectado con vehículo ( $p=0.9997$ ;  $p=0.9937$ , respectivamente; Figuras 3B y 3C, respectivamente) (Udovin et al., 2020).

Figura 3: Inmunotinción de neurofilamentos fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M) y niveles de proteínas en el estriado murino, en el día postnatal 30.



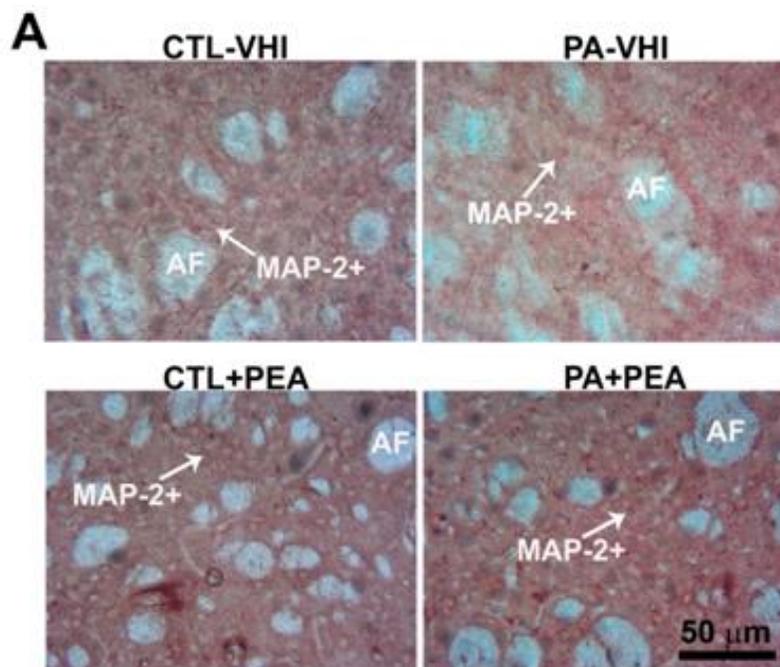


*Figura 3* (Modificado de Udovin et al., 2020): A) Imágenes representativas del estriado de cada grupo experimental obtenidas por tinción inmunohistoquímica para pNF-H/M. La flecha blanca indica los fascículos axonales (AF). Barra de escala: 50  $\mu$ m. B) Porcentaje de las áreas reactivas para pNF-H/M medido para cada grupo experimental. C) Densidad óptica obtenida de bandas inmunorreactivas para el nivel de expresión de proteína pNF-H/M de cada grupo experimental. Las barras y las barras de error representan la media  $\pm$ SEM calculada a través de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de prueba post hoc de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , PA-VHI frente a CTL-VHI. &&&&  $p < 0,0001$  y &  $p < 0,05$ , PA-VHI frente a PA+PEA. #####  $p < 0,0001$  y ##  $p < 0,05$ , PA+PEA frente a CTL-VHI. CTL-VHI: grupo control tratado con vehículo; PA-VHI: grupo sometido a PA y tratado con vehículo; PA+PEA: grupo sometido a PA y tratado con PEA; CTL+PEA: grupo control tratado con PEA.

Dado que la PA afectó al citoesqueleto neuronal, también se estudió la morfología de la dendrita a través de la inmunotinción de un marcador específico de dendrita, MAP-2, en el estriado murino el día postnatal 30. Se pueden observar cambios morfológicos como consecuencia de la PA (Figura 4A). De acuerdo con los resultados del ANOVA de dos vías, se detectó una diferencia significativa en el área reactiva de MAP-2 tanto para las condiciones de nacimiento como de tratamiento ( $F_{(1,8)} = 16629$ ,  $p < 0,0001$ ;  $F_{(1,8)} = 17810$ ,  $p < 0,0001$ , respectivamente). La interacción entre la condición de nacimiento y el tratamiento también fue significativa ( $F_{(1,8)} = 17711$ ,  $p < 0,0001$ ). El análisis post-hoc reveló que el grupo PA con vehículo presentó una disminución significativa en el porcentaje de área reactiva MAP-2 en comparación con el grupo control ( $p < 0,0001$ , Figura 4B). Esta reducción en el área reactiva de MAP-2 mejoró después del tratamiento con PEA ( $p < 0,0001$ , Figura 4B), alcanzando los valores del grupo control ( $p = 0,0515$ , Figura 4B). Estos hallazgos morfológicos se confirmaron cuando se analizó la expresión de la proteína MAP-2 en el estriado de murino en el día postnatal 30. El nivel de proteína MAP-2 dependía de la condición de nacimiento y del tratamiento ( $F_{(1,8)} = 40,14$ ,  $p = 0,0002$ ;  $F_{(1,8)} = 36,83$ ,  $p = 0,0003$ , respectivamente), con una

interacción entre ellos también significativa ( $F_{(1,8)}=36.09$ ,  $p=0.0003$ ). Según el análisis post-hoc, se observó una reducción significativa en los niveles de proteína MAP-2+ como consecuencia de la PA ( $p<0,0001$ , Figura 4C), que se revirtió completamente después del tratamiento con PEA, alcanzando los valores del grupo de control ( $p<0.001$ ), Figura 4C). Finalmente, se encontraron valores similares tanto en el área reactiva de MAP-2 como en los niveles de proteína entre el grupo control tratado con vehículo y el grupo control tratado con PEA ( $p=0.9932$ ;  $p>0.9999$ , respectivamente; Figuras 4B y 4C, respectivamente) (Udovin et al., 2020).

Figura 4: Inmunotinción de proteínas asociadas a los microtúbulos 2 (MAP-2) y expresión de proteínas en el estriado murino, en el día postnatal 30.



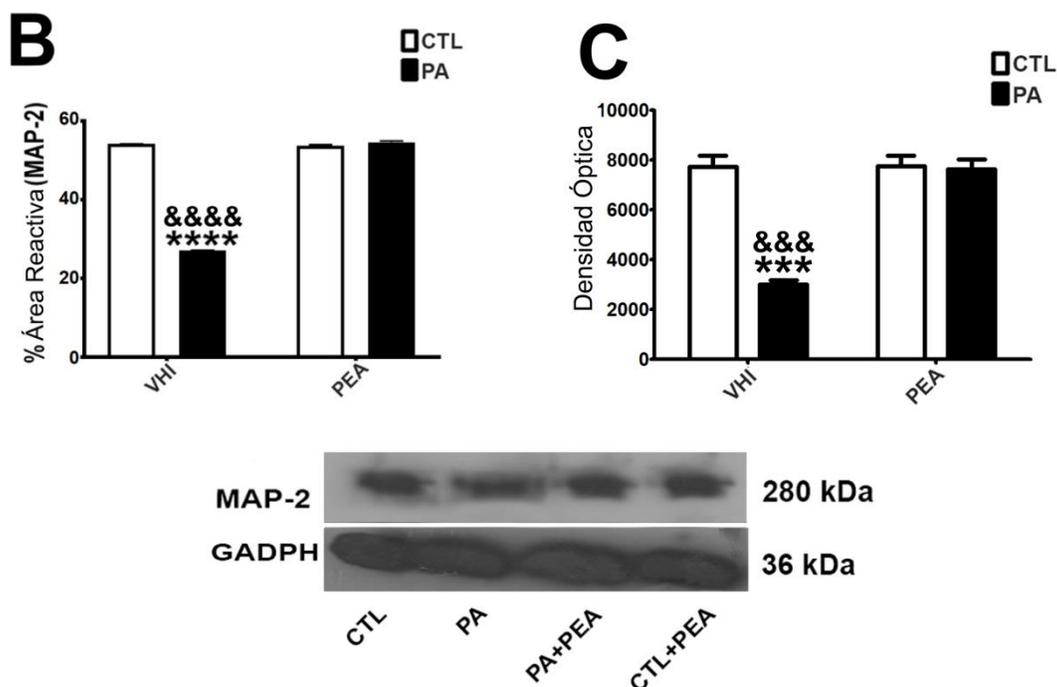
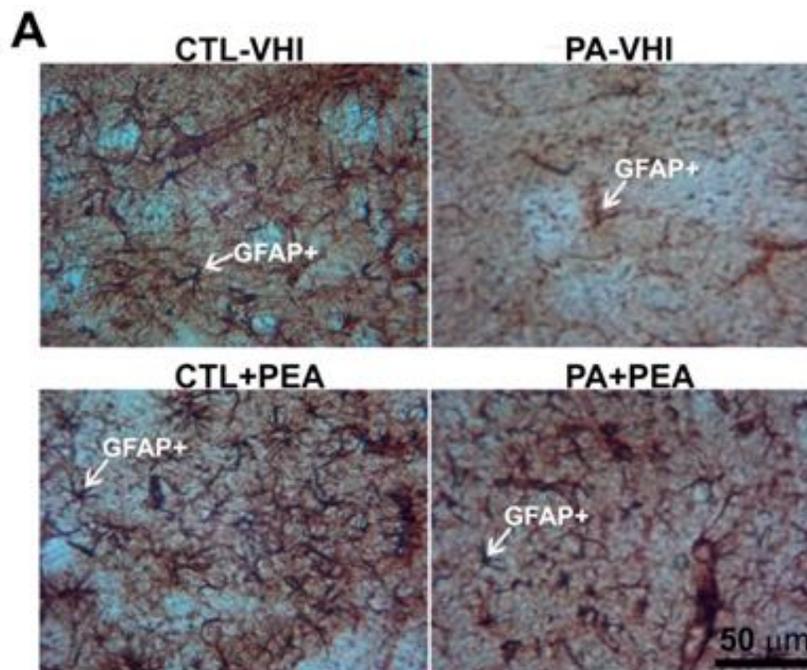


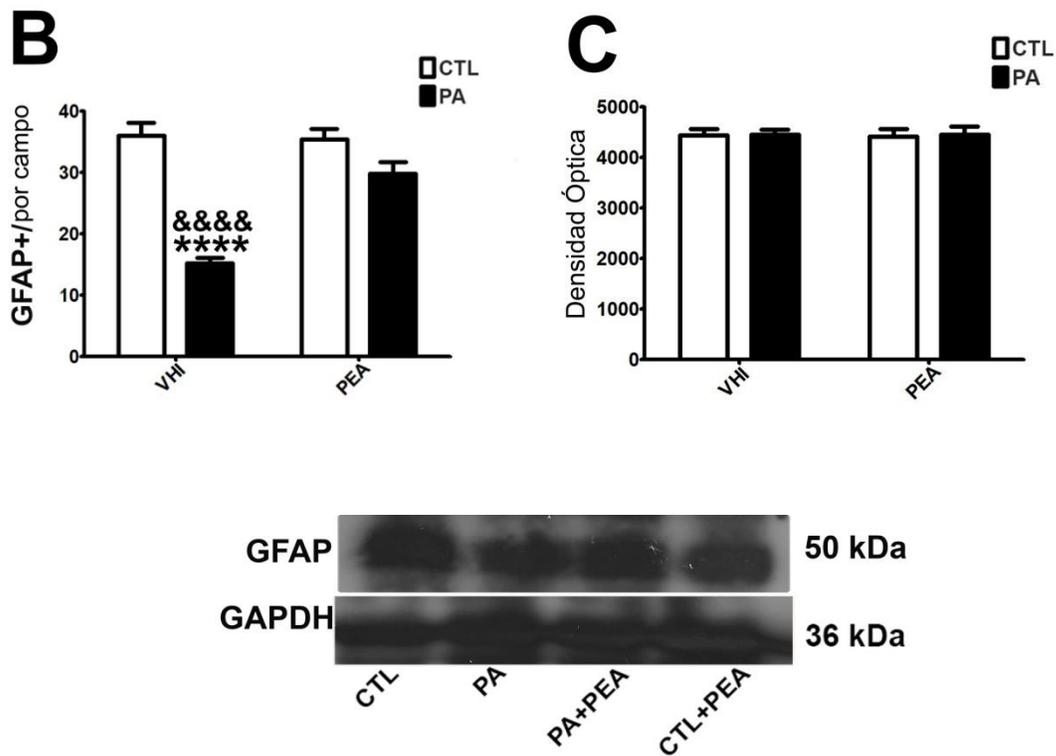
Figura 4 (Modificada de Udovin et al., 2020): A) Imágenes representativas del estriado obtenidas por tinción inmunohistoquímica para MAP-2 en cada grupo experimental. La flecha blancamuestra dendritas inmunoteñidas para MAP-2; AF indica los fascículos axonales. Barra de escala: 50  $\mu$ m. B) Porcentaje de las áreas reactivas para MAP-2 medido en cada grupo experimental. C) Densidad óptica obtenida de bandas inmunorreactivas para el nivel de expresión de la proteína MAP-2 de cada grupo experimental. Las barras y las barras de error representan la media  $\pm$ SEM calculada a través de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de prueba post hoc de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , PA-VHI frente a CTL-VHI; &&&  $p < 0,0001$  y &&&  $p < 0,001$ , PA-VHI frente a PA+PEA. CTL-VHI: grupo control tratado con vehículo; PA-VHI: grupo sometido a PA y tratado con vehículo; PA+PEA: grupo sometido a PA y tratado con PEA; CTL+PEA: grupo control tratado con PEA.

Asimismo se analizó la respuesta glial a la lesión por PA y el resultado del tratamiento con PEA en el estriado murino en el día postnatal 30, a través de la medición de GFAP con las técnicas de Inmunohistoquímica y Western Blot. La Figura 5A muestra un ejemplo representativo de la sección estriatal obtenida por tinción inmunohistoquímica para los astrocitos inmunoreactivos a GFAP. Cuando se midió el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP, el ANOVA de dos vías indicó que este dependía de la condición de nacimiento y del tratamiento recibido ( $F_{(1,56)}=58.73$ ,  $p < 0.0001$ ;  $F_{(1,56)}=16.44$ ,  $p=0.0002$ , respectivamente), así como de

su interacción ( $F_{(1,56)}= 19.4$ ,  $p<0.0001$ ). El análisis post-hoc reveló que el grupo PA con vehículo presentó una disminución significativa en el número de astrocitos inmunoreactivos a GFAP, en comparación con el grupo control ( $p<0,0001$ , Figura 5B), que mejoró después del tratamiento con PEA ( $p<0,0001$ , Figura 5B) aunque no lo suficiente para alcanzar valores similares al grupo control ( $p=0.0628$ , Figura 5B). Además, el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP+ no fue distinto entre el grupo control tratado con vehículo y el grupo control tratado con PEA ( $p=0.9946$ , Figura 5B). Sin embargo, ni la condición de nacimiento ni el tratamiento recibido afectaron a la expresión de GFAP ( $F_{(1,8)}=0.04421$ ,  $p=0.8387$ ;  $F_{(1,8)}=0.01157$ ,  $p=0.917$ , respectivamente) ni se observó una interacción significativa entre estos factores ( $F_{(1, 8)}=0.002636$ ,  $p=0.9603$ , Figura 3C) (Udovin et al., 2020).

Figura 5: Inmunotinción de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y niveles de expresión de proteínas en el estriado murino, en el día postnatal 30.





*Figura 5* (Modificada de Udovin et al., 2020): **A)** Imágenes representativas del estriado obtenidas por tinción inmunohistoquímica para GFAP en cada grupo experimental. La flecha blanca muestra el astrocito con inmunotinción para GFAP. Barra de escala: 50  $\mu$ m. **B)** Número de células GFAP+ medidas en cada grupo experimental. **C)** Densidad óptica obtenida de bandas inmunorreactivas para el nivel de expresión de la proteína GFAP en cada grupo experimental. Las barras y las barras de error representan la media  $\pm$ SEM calculada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de prueba post hoc de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , PA-VHI frente a CTL-VHI. &&&&  $p < 0,0001$ , PA-VHI frente a PA+PEA. CTL-VHI: grupo control tratado con vehículo; PA-VHI: grupo sometido a PA y tratado con vehículo; PA+PEA: grupo sometido a PA y tratado con PEA; CTL+PEA: grupo control tratado con PEA.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Efectos de la PA en el estriado y sus conductas asociadas en el día postnatal 30

En el presente trabajo se investigaron las alteraciones morfológicas, bioquímicas y conductuales inducidas por la PA en el día postnatal 30, utilizando el modelo experimental murino de Bjelke y colaboradores (1991), y asimismo se estudió el efecto neuroprotector que ejerció la PEA en ese lapso.

La PA produjo una disminución significativa en el tiempo dedicado al *rearing*, el cual es un comportamiento de exploración vertical en respuesta a la novedad (Herrera et al., 2018), a través del cual la rata busca obtener mayor información de la que logra explorando horizontalmente, tanto a nivel visual como olfatorio (Lever, Burton & O'Keefe, 2006). Esta conducta se encuentra directamente relacionada con el estriado ya que el núcleo accumbens interviene en su producción, por lo cual la lesión en esta área como consecuencia de la PA podría haber influido en su disminución (Lever et al., 2006). Asimismo esta alteración podría explicarse por el tiempo excesivo dedicado al *grooming* por los animales asfícticos, cuyo aumento se ha vinculado previamente con un aumento en los niveles de ansiedad (Kalueff & Tuohimaa, 2005), los cuales podrían interferir en la exploración libre de las ratas (Lever et al., 2006).

El *grooming* es una conducta típica en roedores, realizada con el fin de acicalamiento, reducción de estrés y termorregulación, la cual se encuentra mediada por los ganglios basales, por lo cual la injuria en el estriado, particularmente en el caudado, el putamen y los sistemas dopaminérgico y GABAérgico, a causa de la PA, puede haber influido en su aumento (Spruijt, Van Hooff & Gispen, 1992; Barros, Tannhauser, Tannhauser & Tannhauser, 1994; Smolinsky, Bergner, LaPorte & Kalueff, 2009). Asimismo esta intensificación puede estar relacionada con el incremento de la temperatura corporal que puede producir el estrés, aumentado por la PA (Barros et al., 1994). Es decir que, al igual que lo ocurrido en el caso del *rearing*, la alteración de esta conducta nos está

señalando altos niveles de ansiedad (Spruijt, 1992; Lever et al., 2006; Smolinsky et al., 2009).

Las modificaciones en las conductas prototípicas no podrían ser causadas por alteraciones en la locomoción o en la actividad global dado que no hubo diferencias en la cantidad de tiempo que los animales estuvieron en los brazos cerrados del Laberinto elevado en cruz como así tampoco en el número de líneas cruzadas ni en la distancia total recorrida tanto en el Campo Abierto como en el Laberinto elevado en cruz (Herrera et al., 2018). En efecto, las alteraciones en la locomotricidad como consecuencia de la PA suelen evidenciarse en edades posteriores, habitualmente a partir de los 45 días postnatales, a través de la hiperactividad (Prut & Belzung, 2003; Simola et al., 2009; Morales et al., 2010), por lo que sería interesante realizar futuros estudios conductuales a largo plazo.

Con respecto al nivel morfológico y bioquímico, se encontraron alteraciones inducidas por la PA, como daño dendrítico (reducción de MAP-2), lesión axonal (reducción de pNF-H/M) y una disminución en el número de astrocitos (células GFAP+) en el estriado murino, en el día postnatal 30. Las modificaciones de MAP-2 y pNF-H/M se confirmaron mediante la técnica de Western Blot. Estos resultados serían el correlato neurobiológico de las alteraciones en la exploración vertical y en los niveles de ansiedad.

Entre los marcadores estudiados se encuentra el MAP-2, que es un biomarcador de uso común para evaluar la extensión y distribución de la degeneración del citoesqueleto dendrítico inducida por la PA (Kühn, Meissner & Oehmichen, 2005; Morales, Huaiquin, Bustamante, Fiedler & Herrera-Marschitz, 2007; Graham, Everett, Delpech & Northington, 2018). Investigaciones previas han mostrado que la inmunoreactividad de MAP-2 disminuyó en el hipocampo y la corteza cerebral humanos después de la exposición al monóxido de carbono (Kühn et al., 2005) y que la oclusión transitoria o permanente de la arteria cerebral media, seguida de reperfusión, redujo la expresión de MAP-2 principalmente en el cuerpo estriado y la neocorteza murinas (Popp, Jaenisch, Witte & Frahm, 2009). Además, la inmunotinción de MAP-2 disminuyó en la corteza cerebral, el caudado y el tálamo en un modelo murino con accidente cerebrovascular perinatal (Malinak

& Silverstein, 1996) y en la corteza cerebral de ratas neonatas después de una hipoxia-isquemia cerebral transitoria (Blomgren et al., 1995). En el presente estudio, se observó que la PA indujo una disminución marcada tanto en el nivel de proteína como en la inmunoreactividad de MAP-2 en el estriado de las ratas en el día postnatal 30. De acuerdo con esto, estudios previos también informaron una reducción significativa de MAP-2 en el estriado (Saraceno et al., 2012) así como en el hipocampo tanto en el día postnatal 30 (Herrera et al., 2018), como en el día postnatal 120 (Saraceno et al., 2010). Esta reducción de MAP-2 podría estar relacionada con una disminución de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) provocada por la baja disponibilidad de oxígeno después del evento hipóxico (Ashworth et al., 2003). Asimismo, recientemente se ha señalado que la disminución de MAP-2 está relacionada con comportamientos ansiosos y disfunciones cognitivas en modelos murinos de isquemia cerebral global (Soares et al., 2016), resultado que concuerda con la presente investigación.

Los resultados también muestran una disminución significativa en el nivel de la proteína y en la inmunoreactividad de pNF-H/M en el estriado, en respuesta a la PA en el día postnatal 30. Investigaciones previas han demostrado que los neurofilamentos cambian su grado de fosforilación después de la hipoxia-isquemia cerebral (Mink & Johnston, 2000) y sirven como biomarcadores clínicos de la encefalopatía hipóxico-isquémica (Douglas-Escobar et al., 2010). Esta disminución en pNF-H/M podría ser el resultado de la activación de la calpaína, una proteasa dependiente de calcio ampliamente distribuida en el cerebro durante la hipoxia, que interviene en los procesos de homeostasis relativos al crecimiento y la muerte celular (Stys & Jiang, 2002). Asimismo, se encontró una pérdida de pNF-H/M en el cuerpo calloso y la cápsula interna en la parálisis cerebral experimental, así como una disminución en el volumen de los mismos (Drobyshevsky et al., 2007). Aunque recientemente se ha demostrado que la PA se asocia con un aumento en el nivel de la proteína y la inmunoreactividad de pNF-H/M en el hipocampo en el día postnatal 30 (Herrera et al., 2018), el nivel de los neurofilamentos varía según la región cerebral, siendo bajo en la corteza cerebral e intermedio a elevado en los axones del tronco encefálico, el cerebelo, el tálamo, la sustancia blanca

subcortical y los ganglios basales, así como también se encuentra una variación en los diferentes tipos de patologías (Shaw et al., 2005; Drobyshevsky et al., 2007; Anderson et al., 2008; Guy et al., 2008; Lewis, Wolper, Miralia, Yang & Shae, 2008; Boylan et al., 2009; Herrera et al., 2018). Teniendo esto en cuenta, la elección de diversas fuentes de tejido puede explicar las discrepancias entre los estudios, lo que haría necesario una mayor investigación sobre el tema, que ayude a comprender mejor estas diferencias.

La PA indujo una disminución notable en el número de células astrogiales, como ya han reportado estudios previos en el día postnatal 30, en el estriado murino, a través del marcador GFAP (Holubiec et al., 2017). Este hallazgo podría atribuirse a la muerte astrocítica, que precedería a la pérdida neuronal y a la reacción inflamatoria, de acuerdo con evidencia anterior (Villapol, Gelot, Renolleau & Charriaut-Marlangue, 2008; Hostenbach, Cambron, D'haeseleer, Kooijman & De Keyser, 2014; Romero et al., 2014). Investigaciones previas han mostrado que los astrocitos dañados severamente por la PA podrían a su vez participar, después de la injuria, en el proceso nocivo en curso, promoviendo la formación de lesiones quísticas como las observadas clínicamente en el cerebro del recién nacido (Villapol et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en el marcador GFAP a través de la técnica inmunohistoquímica no fueron confirmados por la técnica Western Blot. Esto podría relacionarse con el hecho de que, como afirman estudios previos (Saraceno et al., 2016; Herrera et al., 2018), las alteraciones inducidas por la PA en los astrocitos suelen observarse en tiempos posteriores, meses luego de la injuria perinatal (Saraceno et al., 2010; Douglas-Escobar & Weiss, 2015), por lo que la expresión de proteínas puede aún no haberse visto modificada en el día postnatal 30. De todas formas, se necesitarían más estudios para aclarar este punto.

## **7.2. Efecto neuroprotector del tratamiento con PEA**

Los valores disminuidos, como consecuencia de la PA, de la conducta de *rearing* tanto en la prueba de Campo Abierto como en el Laberinto elevado en cruz se vieron restaurados por el tratamiento con PEA, por lo que, en este sentido,

ejerció una protección adecuada. Ahora bien, los animales asfícticos tratados con PEA difirieron en el tiempo dedicado al *grooming* en comparación con las ratas asfícticas inyectadas con vehículo en el Campo Abierto, pero no así en el Laberinto elevado en cruz. Sin embargo, esto podría no ser consecuencia de que la PEA no ejerció un efecto neuroprotector sino de que el hecho de haber medido únicamente el tiempo durante el cual el animal realizaba la conducta de *grooming* puede no haber sido un indicador suficiente. Estudios previos (Spruij et al., 1992; Smolinsky et al., 2009) han señalado que este comportamiento puede verse afectado en su realización, a raíz de injurias cerebrales o drogas, por ejemplo no llevándose a cabo en dirección céfalocaudal o haciéndolo desordenadamente, y no necesariamente en su duración. Por esta razón sería interesante tener en cuenta estos datos en estudios futuros, y entonces poder efectuar un análisis más detallado de la conducta de *grooming*, determinando con mayor seguridad el efecto de la PEA en este caso.

Con respecto a los aspectos morfológico y bioquímico, el tratamiento con PEA dentro de la primera hora de vida fue capaz de atenuar el daño citoesquelético, dendrítico y axonal inducido por la PA en el estriado murino en el día postnatal 30, de acuerdo con las modificaciones observadas tanto en MAP-2 como en pNF-H/M, en la inmunotinción y en los niveles de proteína, respectivamente. Además, la administración de PEA podría prevenir la disminución en el número de células GFAP que se observó en los animales asfícticos. De igual manera, recientemente se ha informado que la PEA ejerce propiedades neuroprotectoras contra las alteraciones del citoesqueleto dendríticas y axonales inducidas por la PA en el hipocampo (Herrera et al., 2018). Asimismo se mostró (Blanco et al., 2015) que la PA indujo una disminución sustancial tanto en el nivel de proteína del receptor PPAR $\alpha$  de PEA como en la fosfolipasa D específica de N-acil fosfatidiletanolamina, que es una enzima que sintetiza aciletanolamidas, como la PEA, también en el día postnatal 30. Esta reducción podría conducir a una desregulación y una disminución en el nivel de los endocannabinoides, inhibiendo la actividad PPAR $\alpha$  (Blanco et al., 2015), lo que estaría involucrado en varios procesos cognitivos y emocionales (Fidaleo, Fanelli,

Ceru & Moreno, 2014). Entonces, la administración exógena de PEA, para contrarrestar estos procesos, puede explicar los efectos protectores informados en esta investigación.

Además, estos hallazgos concuerdan con estudios experimentales anteriores sobre los efectos protectores de la PEA en la neurodegeneración (Skaper et al., 1996; Esposito, Impellizzeri, Mazzon, Paterniti & Cuzzocrea, 2012; Scuderi et al., 2014; Herrera et al., 2016). La PEA ejerció efectos neuroprotectores contra la disminución en la expresión de MAP-2 inducida por péptidos amiloides (Scuderi et al., 2014; Tomasini et al., 2015) y por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina en un modelo animal de enfermedad de Parkinson (Esposito et al., 2012). De manera similar, la PEA podría prevenir la reducción de MAP-2 después de la hipoxia (Kühn et al., 2005; Fernández-López, Lizasoain, Moro & Martínez-Orgado, 2013; England, Hind, Rasid & O'Sullivan, 2015).

### **7.3. Aplicaciones a la Psicología Comparada**

El presente trabajo se llevó a cabo teniendo en cuenta la posible futura aplicación en seres humanos de los hallazgos realizados, es decir, desde la perspectiva de la Psicología Comparada, que procura una mejor comprensión de la persona humana a través del uso, en este caso, de modelos animales de laboratorio, por su mayor sencillez, costo económico, simplicidad en el manejo de variables y motivos éticos (Domjan, 2010). Así también, la experimentación en animales es una de las fases de la Investigación Traslacional, que busca maximizar los beneficios del conocimiento científico, de forma tal que resulte beneficioso para la población general. Esta etapa es necesaria para desarrollar potenciales nuevos tratamientos, evaluando su seguridad y eficacia en primer lugar a través de experimentos controlados en animales de laboratorio (Cabieses & Espinoza, 2011).

En neurociencias, los animales más utilizados en investigación son las ratas y ratones (Coronel Oliveros & Pacheco Calderón, 2018), pero el uso de ratas como animal experimental presenta diversas ventajas respecto a los ratones: poseen un comportamiento más complejo, es más sencillo realizarles cirugías e

intervenciones craneales, por lo que es menor la probabilidad de causar daño al tejido cerebral, y es más simple su manipulación (Ellenbroek & Youn, 2016). Con respecto al modelo murino utilizado en el presente trabajo, este ya se ha mostrado adecuado para la investigación de los orígenes del trastorno por déficit de atención con hiperactividad y de la esquizofrenia (Barkhuizen, 2007) y por reproducir de manera bastante precisa ciertas situaciones de PA prevalentes en la clínica, como la circular de cordón (Capani et al., 2009). Asimismo, se trata de una asfixia de tipo global, que es la más frecuente en situaciones perinatales en seres humanos (Strackx et al., 2010). Además, al existir grandes semejanzas entre el cerebro humano y el de la rata, y tratarse de un animal mamífero, su modo de parto y posibilidad de PA es similar al humano.

También esta investigación se realizó teniendo en cuenta el estudio de Semple y colaboradores (2013), quienes llevan a cabo una comparación entre el desarrollo cerebral murino y humano, basándose principalmente en los hitos madurativos del cerebro, que son similares en ambas especies, señalando la equivalencia aproximada entre los 30 días postnatales de la rata y la edad de entre 4 y 11 años del ser humano, período en el que se suelen manifestar los trastornos del neurodesarrollo asociados a la PA (Herrera-Marschitz et al., 2017). Ahora bien, es necesario recordar que las posibles generalizaciones y/o extrapolaciones de la psicología animal a la humana deben realizarse de manera prudente y adecuada (Chudasama & Robbins, 2006; Ardila, 2007).

En este sentido, son particularmente interesantes los hallazgos conductuales realizados en la presente investigación acerca del aumento de las conductas ansiosas en los animales asfícticos y de su posterior hiperactividad (Prut et al., 2003; Simola et al., 2008; Morales et al., 2009), ya que este incremento también suele encontrarse en niños que han sufrido PA (Prechtl et al., 1997; Calamandrei et al., 2004) y puede relacionarse con trastornos del neurodesarrollo, tales como el trastorno de atención con hiperactividad (Hoeger et al., 2000). Por lo tanto el tratamiento con PEA, sustancia que se halla presente tanto en el cerebro humano como en el murino y que en ambos casos puede ser inyectada asimismo de modo exógeno, parece ser prometedor para aminorar estos comportamientos.

## 8. CONCLUSIÓN

La PA produjo daño neuronal y cambios morfológicos evidenciados a nivel conductual por una disminución del tiempo dedicado a la conducta de *rearing* y un aumento del tiempo dedicado al *grooming*, lo cual se vincula con un comportamiento ansioso. A nivel morfológico y bioquímico, se produjo una reducción en la inmunoreactividad de pNF-H/M y MAP-2, y una disminución en el número de astrocitos GFAP+. Estos resultados a su vez se correlacionaron con una disminución en la expresión de los niveles proteicos de MAP-2 y pNF-H/M.

El tratamiento con PEA dentro de la primera hora de vida produjo mejoras significativas en la actividad exploratoria y una mayor regulación de los niveles de ansiedad, lo cual tuvo su correlato neurobiológico en la atenuación de las alteraciones neuronales inducidas por la PA en el cerebro murino, entre ellas las disfunciones axonales y dendríticas, como así también las modificaciones al nivel de la glía. Por lo tanto, la PEA representaría un agente neuroprotector para las alteraciones en el estriado murino y sus conductas asociadas inducidas por la PA en el día postnatal 30.

En futuras investigaciones se podrán realizar estudios en etapas del desarrollo tanto más tempranas como más tardías, para evaluar el efecto neuroprotector de la PEA en diversas edades. Asimismo, dado que el tratamiento con PEA en algunos casos no pudo revertir completamente el daño producido por la PA, sería interesante combinar esta sustancia con otros tratamientos, como el enriquecimiento ambiental, que ya ha demostrado una efectividad parcial en el modelo experimental de PA (Galeano et al., 2015), de modo de lograr un efecto sinérgico entre ambos procedimientos. De la misma manera, futuros estudios podrán profundizar en la comparación entre ratas y seres humanos, tanto a nivel morfológico y bioquímico como conductual, con la necesaria prudencia en las generalizaciones y/o extrapolaciones de la psicología animal a la humana.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, K. J., Scheff, S. W., Miller, K. M., Roberts, K. N., Gilmer, L. K., Yang, C. et al. (2008). The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 25(9), 1079-1085.
- Ardila, R. (2007) Psicología en el contexto de las ciencias naturales, comportamiento y evolución. *Revista de la Academia colombiana de ciencias*, 31(120), 395-403.
- Arteni, N. S., Pereira, L. O., Rodrigues, A. L., Lavinsky, D., Achaval, M. E. & Netto, C. A. (2010). Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behavioural brain research*, 210(1), 92-98.
- Ashworth, S. L., Southgate, E. L., Sandoval, R. M., Meberg, P. J., Bamburg, J. R. & Molitoris, B. A. (2003). ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(4), F852–F862.
- Barkhuizen, M., Van den Hove, D. L., Vles, J. S., Steinbusch, H. W., Kramer, B. W. & Gavilanes, A. W. (2017). 25 years of research on global asphyxia in the immature rat brain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 75, 166–182.
- Barros, H. M., Tannhauser, S. L., Tannhauser, M. A. & Tannhauser, M. (1994) The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the Open Field. *Pharmacology & Toxicology*, 74(4-5), 339-344.
- Bjelke, B., Andersson, K., Ögren, S. O. & Bolme, P. (1991). Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain research*, 543(1), 1–9.
- Blanco, D., García-Alix, A., Valverde, E., Tenorio, V., Vento, M., Cabañas, F. et al. (2011). Neuroprotección con hipotermia en el recién nacido con encefalopatía hipóxico-isquémica. Guía de estándares para su aplicación clínica. *Anales de pediatría*, 75(5), 341–361.

- Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M. I., Romero, J. I., Logica, T., Rivera, P. et al. (2015). Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 1-16.
- Blomgren, K., McRae, A., Bona, E., Saido, T. C., Karlsson, J. O. & Hagberg, H. (1995). Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Research*, 684(2), 136-142.
- Boksa, P. & El-Khodori, B. F. (2003). Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 91–101.
- Boylan, K., Yang, C., Crook, J., Overstreet, K., Heckman, M., Wang, L. et al. (2009). Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. *Journal of Neurochemistry*, 111(5), 1182-1191.
- Cabieses, B. & Espinoza, M. A. (2011). La investigación traslacional y su aporte para la toma de decisiones en políticas de salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(2), 288–297.
- Calamandrei, G., Venerosi, A. P., Valanzano, A., de Berardinis, M. A., Greco, A., Puopolo, M. et al. (2004). Increased Brain Levels of F2-Isoprostane Are an Early Marker of Behavioral Sequels in a Rat Model of Global Perinatal Asphyxia. *Pediatric Research*, 55(1), 85–92.
- Capani, F., Saraceno, G. E., Botti, V., Aon-Bertolino, L., de Oliveira, D. M., Barreto, G. et al. (2009). Protein ubiquitination in postsynaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia. *Experimental neurology*, 219(2), 404–413.
- Chade, H. (2008). *Neurología paso a paso*. Mendoza: Editorial de la Universidad del Aconcagua.

- Chudasama, Y. & Robbins, T. W. (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: Comparativeneuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biological Psychology* 73, 19-38.
- Cilio, M. R. & Ferriero, D. M. (2010). Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15(5), 293-298.
- Coronel Oliveros, C. & Pacheco Calderón, R. (2018). Ontogenia del comportamiento en ratas en una batería de pruebas conductuales. *Salus*, 22(1),18-25.
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta*. México: Wadsworth.
- Douglas-Escobar, M. & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatrics*, 169(4), 397–403.
- Douglas-Escobar, M., Yang, C., Bennett, J., Shuster, J., Theriaque, D., Leibovici, A. et al. (2010). A pilot study of novel biomarkers in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatric Research*, 68(6), 531-536.
- Drobyshevsky, A., Derrick, M., Wyrwicz, A. M., Ji, X., Englof, I., Ullman, L. M. et al. (2007). White matter injury correlates with hypertonia in an animal model of cerebral palsy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(2), 270-281.
- Ellenbroek, B. & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1079-1087.
- England, T. J., Hind, W. H., Rasid, N. A. & O'Sullivan, S. E. (2015). Cannabinoids in experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(3), 348-358.
- Esposito, E. & Cuzzocrea, S. (2013). Palmitoylethanolamide in Homeostatic and Traumatic Central Nervous System Injuries. *Central Nervous System & Neurological Disorders - Drug Targets*, 12(1), 55-61.
- Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I. & Cuzzocrea, S. (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One*,7(8), e41880.

- Fernández-López, D., Lizasoain, I., Moro, M. A. & Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sciences*, 3(4), 1043-1059.
- Fernández Ríos, L. (1987). Psicología comparada, etología y salud mental. *Revista latinoamericana de psicología*, 19(2), 195-220.
- Ferré, S., Diamond, I., Goldberg, S., Yao, L., Hourani, S., Huang, Z. et al. (2007). Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry: Implications for drug addiction, sleep and pain. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 332–347.
- Fidaleo, M., Fanelli, F., Ceru, M. & Moreno, S. (2014). Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) and its lipid ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 21(24), 2803–2821.
- Fitzgerald, M. J., Gruener, G., & Mtui, E. (2012). *Neuroanatomía clínica y neurociencia*, Barcelona: Elsevier Saunders.
- Galeano, P. (2013). *Efecto protector del ambiente enriquecido y del entrenamiento físico sobre un evento hipóxico isquémico perinatal*. Buenos Aires: ININCA.
- Galeano, P., Blanco Calvo, E., Madureira de Oliveira, D., Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E., et al. (2011). Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *International journal of developmental neuroscience* 29(6), 609–619.
- Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Rodríguez de Fonseca, F., et al. (2015). Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middleaged rats subjected to perinatal asphyxia. *Frontiers in Behavioral neuroscience*, 8, 1-12.
- Graham, E. M., Everett, A. D., Delpech, J. C., & Northington, F. J. (2018). Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art. *Current Opinion in Pediatrics*, 30, 199-203.
- Grimaldi, M., Romer, I., González de Apodaca, M., Iturbe, L., Catania, I., González, J. et al. (2012) Early changes in the synapse of the neostriatum induced by perinatal asphyxia. *Nutritional neuroscience*, 15(3), 103-10.

- Grupo Interinstitucional de las Naciones Unidas sobre la Estimación de la Mortalidad en la Niñez (2019). *Levels & Trends in Child Mortality: Report 2019. Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation*. New York: United Nations Children's Fund.
- Guida, F., Boccella, S., Iannotta, M., De Gregorio, D., Giordano, C., Belardo, C. et al. (2017). Palmitoylethanolamide reduces neuropsychiatric behaviors by restoring cortical electrophysiological activity in a mouse model of mild traumatic brain injury. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1-14.
- Gupta, K., Jadhav, J. & Shrikhande, D. (2018). Study of clinical manifestations and complications of perinatal asphyxia: Observational study. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 7(4), 342 – 345.
- Guy, J., Shaw, G., Ross-Cisneros, F. N., Quiros, P., Salomao, S. R., Berezovsky, Y. et al. (2008). Phosphorylated neurofilament heavy chain is a marker of neurodegeneration in Leber hereditary optic neuropathy (LHON). *Molecular Vision*, 14, 2443-2450.
- Herrera, M., Kölliker-Frers, R., Barreto, G., Blanco, E., & Capani, F. (2016). Glial Modulation by N-acylethanolamides in Brain Injury and Neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 1-10.
- Herrera, M., Otero-Losada, M., Udovin, L., Kusnier, C., Kölliker-Frers, R., de Souza, W., et al. (2017). Could perinatal asphyxia induce a synaptopathy? New highlights from an experimental model. *Neural plasticity*, 2017, 1-8.
- Herrera M., Udovin L., Toro-Urrego N., Kusnier C., Luaces J. & Capani F. (2018) Palmitoylethanolamide Ameliorates Hippocampal Damage and Behavioral Dysfunction After Perinatal Asphyxia in the Immature Rat Brain. *Frontiers in neuroscience*, 12, 145-155.
- Herrera, M. I. (2019). *Neuroprotección en asfixia perinatal. Evaluación de los efectos psicobiológicos tempranos del tratamiento con Palmitoiletanolamida*. Tesis de doctorado no publicada. Pontificia Universidad Católica Argentina. Buenos Aires.
- Herrera-Marschitz, M., Morales P., Leyton L., Bustamante D., Klawitter V., Espina-Marchant P. et al. (2011). Perinatal asphyxia: current status and approaches

- towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotoxicity Research*, 19, 603–627.
- Herrera-Marschitz, M., Neira-Pena, T., Rojas-Mancilla, E., Espina-Marchant, P., Esmar, D., Perez, R. et al. (2014). Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. *Frontiers in neuroscience*, 8, 40-57.
- Herrera-Marschitz, M., Perez-Lobos, R., Lespay-Rebolledo, C., Tapia-Bustos, A., Casanova-Ortiz, E., Morales, P., et al. (2017). Targeting sentinel proteins and extrasynaptic glutamate receptors: a therapeutic strategy for preventing the effects elicited by perinatal asphyxia? *Neurotoxicity research*, 33, 461-473.
- Hoeger, H., Engelmann, M., Bernert, G., Scidl, R., Bubna-Littitz, H., Mosgoeller, W. et al. (2000). Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences*, 66(10), 947-962.
- Holubiec, M. I., Romero, J. I., Blanco, E., Tornatore, T. L., Suarez, J., de Fonseca, F. et al. (2017). Acylethanolamides and endocannabinoid signaling system in dorsal striatum of rats exposed to perinatal asphyxia. *Neuroscience letters*, 653, 269–275.
- Hostenbach, S., Cambron, M., D'haeseleer, M., Kooijman, R. & De Keyser, J. (2014). Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neuroscience letters*, 565, 39-41.
- Kalueff, A. V. & Tuohimaa, P. (2005). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology*, 508(1), 147–153.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. & Jessel, T. (eds.) (2001). *Principios de neurociencia*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Kühn, J., Meissner, C. & Oehmichen, M. (2005). Microtubule-associated protein 2 (MAP2)—a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. *Acta Neuropathologica*, 110(6), 579–586.
- Lever, C., Burton, S. & O'Keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences* 17(1), 111–134.

- Lewis, S. B., Wolper, R. A., Miralia, L., Yang, C. & Shaw, G. (2008). Detection of phosphorylated NF-H in the cerebrospinal fluid and blood of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(6), 1261-1271.
- Malinak, C. & Silverstein, F. S. (1996). Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biology of the Neonate*, 69(4), 257-267.
- Mink, R. B. & Johnston, J. A. (2000). Changes in brain neurofilament and betatubulin proteins after cerebral hypoxia-ischemia in rabbits. *Pathobiology* 68, 43–52.
- Modabbernia, A., Mollon, J., Boffetta, P. & Reichenberg, A. (2016) Impaired Gas Exchange at Birth and Risk of Intellectual Disability and Autism: A Meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1847–1859.
- Molina, S. J., Capani, F. & Guelman, L. R. (2016). Noise exposure of immature rats can induce different age-dependent extra-auditory alterations that can be partially restored by rearing animals in an enriched environment. *Brain research*, 1636, 52–61.
- Morales, P., Bustamante, D., Espina-Marchant, P., Neira-Peña, T., Gutiérrez Hernández, M. A., Allende-Castro, C. et al. (2011). Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes? *EPMA Journal*, 2(2), 211–230.
- Morales, P., Huaiquin, P., Bustamante, D., Fiedler, J. & Herrera-Marschitz, M. (2007). Perinatal asphyxia induces neurogenesis in hippocampus: an organotypic culture study. *Neurotoxicity Research*, 12(1), 81–84.
- Morales, P., Simola, N., Bustamante, D., Lisboa, F., Fiedler, J., Gebicke-Haerter, P. J. et al. (2010). Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. *Experimental brain research*, 202(1), 1-14.
- Muccioli, G. & Stella, N. (2008). Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology*, 54(1), 16-22.

- Muñiz, J., Romero, J., Holubiec, M., Barreto, G., González, J., Saint-Martin, M. et al. (2014). Neuroprotective effects of hypothermia on synaptic actin cytoskeletal changes induced by perinatal asphyxia. *Brain research*, 1563, 81–90.
- OMS & UNICEF (2014). *Todos los Recién Nacidos: un plan de acción para poner fin a la mortalidad prevenible: Resumen de orientación*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Papini, M. (2010). *Comparative psychology: Evolution and development of behavior*. New York: Psychology Press.
- Perna, R., & Cooper, D. (2012). Perinatal cyanosis: long-term cognitive sequelae and behavioral consequences. *Applied neuropsychology: Child*, 1(1), 48–52.
- Pinel, J. (2007). *Biopsicología*. Madrid: Pearson.
- Popp, A., Jaenisch, N., Witte, O. W. & Frahm, C. (2009). Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*, 4, e4764.
- Prechtl, H. F., Einspieler, C., Cioni, G., Bos, A. F., Ferrari, F. & Sontheimer, D. (1997). An early marker for neurological deficits after perinatal brain lesions. *The Lancet*, 349(9062), 1361–1363.
- Prut, L. & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1), 3-33.
- Pugliese, V., Bruni, A., Carbone, E., Calabró, G., Cerminara, G., Sampogna, G. et al. (2019) Maternal stress, prenatal medical illnesses and obstetric complications: risk factors for Schizophrenia Spectrum Disorder, Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder. *Psychiatry Research* 271, 23-30.
- Rodríguez-Oroz M. C., Blesa F. J., Benítez-Temino B., Guridi J., Rodríguez M. & Obeso J. A. (2007). Denervación dopaminérgica y fisiopatología de los ganglios basales. *Revista de Neurología*, 3(5), 32-41.
- Romero, J. I., Hanschmann, E. M., Gellert, M., Eitner, S., Holubiec, M. I., Blanco-Calvo, E. et al. (2015). Thioredoxin 1 and glutaredoxin 2 contribute to maintain the phenotype and integrity of neurons following perinatal asphyxia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(6), 1274-1285.

- Romero, J., Muñiz, J., Logica Tornatore, T., Holubiec, M., González, J., Barreto, G. E. et al. (2014). Dual role of astrocytes in perinatal asphyxia injury and neuroprotection. *Neuroscience Letters*, 565, 42-46.
- Saraceno, G. E., Ayala, M. V., Badorrey, M. S., Holubiec, M., Romero, J. I., Galeano, P. et al. (2012). Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton. *Synapse*, 66(1), 9-19.
- Saraceno, G. E., Bertolino, M. L., Galeano, P., Romero, J. I., Garcia-Segura, L. M. & Capani, F. (2010). Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Experimental Neurology*, 223(2), 615-622.
- Saraceno, G. E., Caceres, L. G., Guelman, L. R., Castilla, R., Udovin, L. D., Ellisman, M. H. et al. (2016). Consequences of excessive plasticity in the hippocampus induced by perinatal asphyxia. *Experimental neurology*, 286, 116–123.
- Schieve, L. A., Tian, L. H., Baio, J., Rankin, K., Rosenberg, D., Wiggins, L. et al. (2014) Population attributable fractions for three perinatal risk factors for autism spectrum disorders, 2002 and 2008 autism and developmental disabilities monitoring network. *Annals of Epidemiology*, 24(4), 260–266.
- Scuderi, C., Stecca, C., Valenza, M., Ratano, P., Bronzuoli, M. R., Bartoli, S. et al. (2014). Palmitoylethanolamide controls reactive gliosis and exerts neuroprotective functions in a rat model of Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease*, 5(9), e1419.
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology*, 106, 1–16.
- Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Parker Mickle, J., Scheff, S. et al. (2005). Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 336(4), 1268-1277.

- Simola, N., Bustamante, D., Pinna, A., Pontis, S., Morales, P., Morelli, M. et al. (2009). Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Experimental brain research*, 185(4), 595-601.
- Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. et al. (1996). The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed post glutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 3984-3989.
- Smolinsky, A., Bergner, C., LaPorte, J. & Kalueff, A. (2009). Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety and depression. *Neuromethods*, 42, 21-36.
- Soares, L. M., De Vry, J., Steinbusch, H. W., Milani, H., Prickaerts, J. & Weffort de Oliveira, R. M. (2016). Rolipram improves cognition, reduces anxiety-and despair-like behaviors and impacts hippocampal neuroplasticity after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience*, 326, 69–83.
- Spruijt, B., Van Hooff, J. A. & Gispen, W. H. (1992). Ethology and Neurobiology of Grooming Behavior. *Physiological Reviews*, 72(3), 825-852.
- Strackx, E., Van den Hove, D. L., Prickaerts, J., Zimmermann, L., Steinbusch, H. W., Blanco, C. E. et al. (2010). Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood *Behavioural brain research*, 208(2), 343-351.
- Stys, P. K. & Jiang, Q. (2002). Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons. *Neuroscience Letters*, 328(2), 150-154.
- Tomasini, M. C., Borelli, A. C., Beggiato, S., Ferraro, L., Cassano, T., Tanganelli, S. et al. (2015). Differential Effects of Palmitoylethanolamide against Amyloid- $\beta$  Induced Toxicity in Cortical Neuronal and Astrocytic Primary Cultures from Wild-Type and 3xTg-AD Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 46, 407–421.
- Udovin L., Kobiec T., Herrera M. I., Toro-Urrego N., Kusnier C., Kölliker-Frers R. et al. (2020) Partial Reversal of Striatal Damage by Palmitoylethanolamide Administration Following Perinatal Asphyxia. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1345.

- Villapol, S., Gelot, A., Renolleau, S. & Charriaut-Marlangue, C. (2008). Astrocyte responses after neonatal ischemia: the yin and the yang. *Neuroscientist*, 14, 339-344.
- Wall, P. & Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 275–286.

## 10. APÉNDICE

Año	Autor	Título	Tipo de texto	Objetivos
1987	Fernández Ríos, L.	Psicología comparada, etología y salud mental	Artículo teórico	Comparar la psicología comparada con la etología y analizar sus relaciones con el estudio de la salud mental en seres humanos.
1991	Bjelke, B., Andersson, K., Ögren, S. O. & Bolme, P.	Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission	Artículo empírico Suecia	Crear un nuevo modelo de PA por sumersión. Análisis de los efecto de PA en la sustancia nigra y los neurotransmisores dopaminérgicos.
1992	Spruijt, B., Van Hooff, J. A. & Gispen, W. H.	Ethology and Neurobiology of Grooming Behavior	Artículo teórico	Explicar a nivel neurobiológico la conducta de <i>grooming</i> en diversos animales.
1994	Barros, H. M., Tannhauser, S. L., Tannhauser, M. A. & Tannhauser, M.	The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the Open Field	Artículo empírico Brasil	Estudiar la influencia de los fármacos GABAérgicos en el <i>grooming</i> murino, en la prueba de Campo Abierto.
1995	Blomgren, K., McRae, A., Bona, E., Saido, T. C., Karlsson, J. O. & Hagberg, H.	Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia	Artículo empírico Suecia	Analizar el marcador MAP-2 en casos de hipoxia-isquemia neonatal.

1996	Malinak, C. & Silverstein, F. S.	Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar el marcador MAP-2 en casos de hipoxia-isquemia murina.
1996	Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. et al.	The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed post glutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons	Artículo empírico Italia	Identificar el efecto neuroprotector de la PEA y los cannabinoides en neuronas del cerebelo.
1997	Prechtl, H. F., Einspieler, C., Cioni, G., Bos, A. F., Ferrari, F. & Sontheimer, D.	An early marker for neurological deficits after perinatal brain lesions	Artículo empírico Alemania e Italia	Explorar los marcadores tempranos de lesiones cerebrales perinatales.
2000	Hoeger, H., Engelmann, M., Bernert, G., Scidl, R., Bubna-Littitz, H., Mosgoeller, W. et al.	Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat	Artículo empírico Austria	Estudiar los efectos neurológicos y conductuales de la PA en ratas.
2000	Mink, R. B. & Johnston, J. A.	Changes in brain neurofilament and betatubulin proteins after cerebral hypoxia-ischemia in rabbits	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar el marcador de neurofilamentos en casos de hipoxia-isquemia en conejos.
2001	Kandel, E. R., Schwartz, J. & Jessel, T. (eds.)	Principios de neurociencia	Libro	Realizar una introducción a las neurociencias.
2001	Wall, P. & Messier, C.	Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior	Artículo teórico	Analizar la validez del laberinto elevado en cruz para medir el comportamiento ansioso en animales.

2002	Stys, P. K. & Jiang, Q.	Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons	Artículo empírico Canadá	Analizar la injuria en los neurofilamentos de ratas expuestas a anoxia e isquemia.
2003	Ashworth, S. L., Southgate, E. L., Sandoval, R. M., Meberg, P. J., Bamburg, J. R. & Molitoris, B. A.	ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion	Artículo empírico Estados Unidos	Estudiar el rol del factor ADF en el daño del citoesqueleto neuronal en casos de isquemia.
2003	Boksa, P. & El-Khodor, B. F.	Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders	Artículo teórico	Realizar una revisión de resultados experimentales en modelos animales en relación a las alteraciones dopaminérgicas y las psicosis.
2003	Prut, L. & Belzung, C.	The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review	Artículo teórico	Realizar una revisión sobre el Campo Abierto como prueba para medir la ansiedad.
2004	Calamandrei, G., Venerosi, A. P., Valanzano, A., de Berardinis, M. A., Greco, A., Puopolo, M. et al.	Increased Brain Levels of F2-Isoprostane Are an Early Marker of Behavioral Sequels in a Rat Model of Global Perinatal Asphyxia	Artículo empírico Italia	Estudiar el F2-Isoprostano como marcador temprano de injuria en casos de asfixia perinatal.
2005	Kalueff, A. V. & Tuohimaa, P.	Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs	Artículo empírico Finlandia	Estudiar el <i>grooming</i> como marcador de ansiedad en fármacos GABAérgicos

2005	Kühn, J., Meissner, C., & Oehmichen, M.	Microtubule-associated protein 2 (MAP2)—a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia	Artículo empírico Alemania	Analizar el marcador MAP-2 en casos de hipoxia-isquemia.
2005	Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Parker Mickle, J., Scheff, S. et al.	Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury	Artículo empírico Estados Unidos	Estudiar los neurofilamentos fosforilados como marcador de injuria axonal.
2006	Chudasama, Y. & Robbins, T. W.	Functions of frontostriatal systems in cognition: Comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans	Artículo teórico	Analizar el uso de psicología comparada en diversas funciones y animales. Hacer una síntesis de artículos previos sobre psicología comparada.
2006	Lever, C., Burton, S. & O'Keefe, J.	Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation	Artículo teórico	Realizar una revisión sobre el <i>rearing</i> en roedores, y su relación con el hipocampo.
2007	Ardila, R.	Psicología en el contexto de las ciencias naturales, comportamiento y evolución.	Artículo teórico	Resumir y analizar la naturaleza e historia de la psicología comparada, en particular en relación con las teorías evolucionistas.
2007	Drobyshevsky, A., Derrick, M., Wyrwicz, A. M., Ji, X., Englof, I., Ullman, L. M. et al.	White matter injury correlates with hypertonia in an animal model of cerebral palsy	Artículo empírico Estados Unidos	Correlacionar daños en la materia blanca con déficits motores y posturales a raíz de parálisis cerebral.
2007	Ferré, S., Diamond, I., Goldberg, S., Yao, L., Hourani, S., Huang, Z. et al.	Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry: Implications for drug addiction, sleep and pain	Artículo teórico	Estudiar la relación entre estriado, adicción a drogas, dolor y sueño.

2007	Morales, P., Huaiquin, P., Bustamante, D., Fiedler, J. & Herrera- Marschitz, M.	Perinatal asphyxia induces neurogenesis in hippocampus: an organotypic culture study	Artículo empírico Chile	Estudiar los efectos de la PA en el hipocampo.
2007	Pinel, J.	Biopsicología	Libro	Introducir al estudio de la Psicobiología y sus ramas.
2007	Rodríguez-Oroz M. C., Blesa F. J., Benítez-Temino B., Guridi J., Rodríguez M. & Obeso J. A.	Denervación dopaminérgica y fisiopatología de los ganglios basales	Artículo teórico	Explicar la vía dopaminérgica en los ganglios basales.
2008	Anderson, K. J., Scheff, S. W., Miller, K. M., Roberts, K. N., Gilmer, L. K., Yang, C. et al.	The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar los neurofilamentos fosforilados como marcadores de injuria cerebral.
2008	Chade, H.	Neurología paso a paso	Libro	Introducción a la neurología
2008	Guy, J., Shaw, G., Ross-Cisneros, F. N., Quiros, P., Salomao, S. R., Berezovsky, Y. et al.	Phosphorylated neurofilament heavy chain is a marker of neurodegeneration in Leber hereditary optic neuropathy (LHON)	Artículo empírico Estados Unidos	Estudiar el rol de los neurofilamentos fosforilados como biomarcadores en la enfermedad de LHON.
2008	Lewis, S. B., Wolper, R. A., Miralia, L., Yang, C. & Shaw, G.	Detection of phosphorylated NF-H in the cerebrospinal fluid and blood of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar el marcador de neurofilamentos fosforilados en casos de aneurisma.
2008	Muccioli, G. & Stella, N.	Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide	Artículo empírico Estados Unidos	Estudiar el rol de la PEA en la microglía.
2008	Simola, N., Bustamante, D., Pinna, A., Pontis, S., Morales, P.,	Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats	Artículo empírico Italia	Analizar las alteraciones motoras en ratas adultas a raíz de PA.

	Morelli, M. & Herrera-Marschitz, M.			
2008	Villapol, S., Gelot, A., Renolleau, S. & Charriaut-Marlangue, C.	Astrocyte responses after neonatal ischemia: the yin and the yang	Artículo teórico	Estudiar los efectos de la isquemia neonatal sobre los astrocitos.
2009	Boylan, K., Yang, C., Crook, J., Overstreet, K., Heckman, M., Wang, L. et al.	Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar los neurofilamentos fosforilados como posibles marcadores de daño axonal en modelos murinos.
2009	Capani, F., Saraceno, G. E., Botti, V., Aon-Bertolino, L., de Oliveira, D. M., Barreto, G., et al.	Protein ubiquitination in postsynaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia	Artículo empírico Argentina	Estudiar el efecto de la hipotermia como factor protector en la ubiquitinación de proteínas en las densidades postsinápticas.
2009	Popp, A., Jaenisch, N., Witte, O. W. & Frahm, C.	Identification of ischemic regions in a rat model of stroke	Artículo empírico Alemania	Identificar las áreas cerebrales afectadas por la isquemia en un infarto cerebral murino.
2009	Smolinsky, A., Bergner, C., LaPorte, J. & Kalueff, A.	Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety and depression	Artículo teórico	Estudiar la importancia del análisis de la conducta de grooming para medir el estrés, la ansiedad y la depresión en animales.
2010	Arteni, N. S., Pereira, L. O., Rodrigues, A. L., Lavinsky, D., Achaval, M. E. & Netto, C. A	Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat	Artículo empírico Brasil	Analizar la PA teniendo en cuenta la lateralización cerebral murina y el sexo del animal.
2010	Cilio, M. R. & Ferriero, D. M.	Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia	Artículo teórico	Resumir los agents neuroprotectores

				conocidos en caso de hipotermia, y su efecto sinérgico en terapias combinadas.
2010	Domjan, M.	Principios de aprendizaje y conducta	Libro	Reseñar la historia de la psicología experimental, haciendo hincapié en el trabajo con animales.
2010	Douglas-Escobar, M., Yang, C., Bennett, J., Shuster, J., Theriaque, D., Leibovici, A. et al.	A pilot study of novel biomarkers in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar diversos marcadores de daño cerebral en casos de hipoxia e isquemia.
2010	Morales, P., Simola, N., Bustamante, D., Lisboa, F., Fiedler, J., Gebicke-Haerter, P. J. et al.	Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats	Artículo empírico Chile	Estudiar el efecto neuroprotector de la nicotinamida en casos de PA.
2010	Papini, M.	Comparative psychology: Evolution and development of behavior	Libro	Resumir la historia de la psicología comparada y sus avances durante el último tiempo.
2010	Saraceno, G. E., Bertolino, M. L., Galeano, P., Romero, J. I., Garcia-Segura, L. M. & Capani, F.	Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Estudiar el efecto del estradiol como terapia en la adultez, en casos de PA.
2010	Strackx, E., Van den Hove, D. L., Prickaerts, J., Zimmermann, L., Steinbusch, H. W., Blanco, C. E., y Vles, J.	Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood	Artículo empírico Alemania	Estudiar la asfisia prenatal como factor protector de consecuencias en la adultez de la PA.

2011	Blanco, D., García-Alix, A., Valverde, E., Tenorio, V., Vento, M., Cabañas, F. et al.	Neuroprotección con hipotermia en el recién nacido con encefalopatía hipóxico-isquémica. Guía de estándares para su aplicación clínica.	Artículo teórico	Describir y analizar protocolos de neuroprotección en PA con hipotermia.
2011	Cabieses, B. & Espinoza, M. A.	La investigación traslacional y su aporte para la toma de decisiones en políticas de salud.	Artículo teórico	Describir la investigación traslacional, su realización y beneficios.
2011	Galeano, P., Blanco Calvo, E., Madureira de Oliveira, D., Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E. et al.	Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift	Artículo empírico Argentina	Describir los efectos a largo plazo de la PA en conductas exploratorias y memoria.
2011	Herrera-Marschitz, M., Morales P., Leyton L., Bustamante D., Klawitter V., Espina-Marchant P. et al.	Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins	Artículo teórico	Realizar una revisión sobre neuroprotección en PA, centrándose en las proteínas centinelas.
2011	Morales, P., Bustamante, D., Espina-Marchant, P., Neira-Peña, T., Gutiérrez Hernández, M. A., Allende-Castro, C. et al.	Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes?	Artículo teórico	Analizar los efectos de la PA sobre la memoria y las diferencias individuales entre los animales.
2012	Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I. & Cuzzocrea, S.	Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease	Artículo empírico Italia	Estudiar el rol neuroprotector de la PEA en la enfermedad de Parkinson.
2012	Fitzgerald, M. J., Gruener, G., & Mtui, E.	Neuroanatomía clínica y neurociencia	Libro	Describir y aplicar la neuroanatomía y la neurociencia

2012	Grimaldi, M., Romer, I., González de Apodaca, M., Iturbe, L., Catania, I., González, J. et al.	Early changes in the synapse of the neostriatum induced by perinatal asphyxia.	Artículo empírico Argentina	Estudiar las alteraciones sinápticas en el estriado en casos de PA.
2012	Perna, R. & Cooper, D.	Perinatal cyanosis: long-term cognitive sequelae and behavioral consequences	Artículo empírico Estados Unidos	Analizar los problemas del neurodesarrollo a largo plazo a raíz de PA.
2012	Saraceno, G. E., Ayala, M. V., Badorrey, M. S., Holubiec, M., Romero, J. I., Galeano, P. et al.	Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton	Artículo empírico Argentina	Estudiar los efectos de la PA en el estriado.
2013	Esposito, E. & Cuzzocrea, S.	Palmitoylethanolamide in Homeostatic and Traumatic Central Nervous System Injuries	Artículo teórico	Estudiar el papel neuroprotector de la PEA en injurias del Sistema Nervioso Central
2013	Fernández- López, D., Lizasoain, I., Moro, M. A. & Martínez- Orgado, J.	Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury	Artículo teórico	Estudiar el rol neuroprotector de los cannabinoides en las injurias perinatales.
2013	Galeano, P.	Efecto protector del ambiente enriquecido y del entrenamiento físico sobre un evento hipóxico isquémico perinatal.	Libro	Analizar el efecto neuroprotector del ambiente enriquecido en PA.
2013	Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble- Haeusslein, L. J.	Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species	Artículo teórico	Identificar los marcadores de maduración y vulnerabilidad, comparando cerebros humanos y murinos.
2014	Fidaleo, M., Fanelli, F., Ceru, M. & Moreno, S.	Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and its lipid ligands	Artículo teórico	Analizar el papel neuroprotector de PPAR $\alpha$ y sus lípidos ligandos,

				entre ellos la PEA.
2014	Herrera-Marschitz, M., Neira-Pena, T., Rojas-Mancilla, E., Espina-Marchant, P., Esmar, D., and Perez, R. et al.	Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset.	Artículo teórico	Estudiar las complicaciones neurológicas de AP, basándose en el modelo sueco.
2014	Hostenbach, S., Cambron, M., D'haeseleer, M., Kooijman, R. & De Keyser, J.	Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders	Artículo teórico	Realizar una reseña sobre los daños en los astrocitos en patologías neuroinflamatorias.
2014	Muñiz, J., Romero, J., Holubiec, M., Barreto, G., González, J., Saint-Martin, M. et al.	Neuroprotective effects of hypothermia on synaptic actin cytoskeletal changes induced by perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Analizar la neuroprotección a través de hipotermia en casos de PA, especialmente en cuanto a neurodegeneración.
2014	OMS & UNICEF	Todos los Recién Nacidos: un plan de acción para poner fin a la mortalidad prevenible: Resumen de orientación	Libro	Presentar una síntesis del programa "Todos los recién nacidos".
2014	Romero, J., Muñiz, J., Logica Tornatore, T., Holubiec, M., González, J., Barreto, G. E. et al.	Dual role of astrocytes in perinatal asphyxia injury and neuroprotection	Artículo teórico	Realizar una revisión de estudios sobre los astrocitos en casos de PA.
2014	Schieve, L. A., Tian, L. H., Baio, J., Rankin, K., Rosenberg, D., Wiggins, L. et al.	Population attributable fractions for three perinatal risk factors for autism spectrum disorders, 2002 and 2008 autism and developmental disabilities monitoring network	Artículo empírico Estados Unidos	Relacionar factores de riesgo perinatales con trastornos del espectro autista.
2014	Scuderi, C., Stecca, C., Valenza, M., Ratano, P.,	Palmitoylethanolamide controls reactive gliosis and exerts neuroprotective functions in a rat model of Alzheimer's disease	Artículo empírico Italia	Estudiar el efecto neuroprotector de la PEA en la enfermedad de

	Bronzuoli, M. R., Bartoli, S. et al.			Alzheimer.
2015	Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M. I., Romero, J. I., Logica, T., Rivera, P. et al.	Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats	Artículo empírico Argentina	Estudiar los efectos de AP en el hipocampo, con neuroprotección endocanabinoide.
2015	Douglas-Escobar, M. & Weiss, M. D.	Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician.	Artículo teórico	Realizar una revisión bibliográfica de artículos sobre efectos neurológicos de PA.
2015	England, T. J., Hind, W. H., Rasid, N. A. & O'Sullivan, S. E.	Cannabinoids in experimental stroke: a systematic review and meta-analysis	Artículo teórico	Realizar una revisión bibliográfica y un meta-análisis sobre el uso de cannabinoides en infartos cerebrales.
2015	Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Rodríguez de Fonseca, F., et al.	Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middleaged rats subjected to perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Analizar la injuria por PA en ratas adultas y su neuroprotección a través de ambiente enriquecido.
2015	Romero, J. I., Hanschmann, E. M., Gellert, M., Eitner, S., Holubiec, M. I., Blanco-Calvo, E. et al.	Thioredoxin 1 and glutaredoxin 2 contribute to maintain the phenotype and integrity of neurons following perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Investigar la protección neuronal en casos de PA a través de tioredoxina 1 y glutaredoxina 2.
2015	Tomasini, M. C., Borelli, A. C., Beggiato, S., Ferraro, L., Cassano, T., Tanganelli, S. et	Differential Effects of Palmitoylethanolamide against Amyloid- $\beta$ Induced Toxicity in Cortical Neuronal and Astrocytic Primary Cultures from Wild-Type and 3xTg-AD Mice	Artículo empírico Italia	Estudiar el efecto neuroprotector de la PEA en neuronas corticales y astrocitos sometidos a

	al.			toxicidad.
2016	Ellenbroek, B. & Youn, J.	Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?	Artículo teórico	Analizar el uso de modelos experimentales con roedores en las neurociencias.
2016	Herrera, M., Kölliker-Frers, R., Barreto, G., Blanco, E., & Capani, F.	Glial Modulation by N-acylethanolamides in Brain Injury and Neurodegeneration	Artículo teórico	Analizar el alcance neuroprotector de las aciletanolamidas en caso de injuria cerebral y neurodegeneración
2016	Modabbernia, A., Mollon, J., Boffetta, P. & Reichenberg, A.	Impaired Gas Exchange at Birth and Risk of Intellectual Disability and Autism: A Meta-analysis	Artículo teórico	Meta-análisis de la relación entre asfixia perinatal y trastornos del espectro autista y discapacidad intelectual.
2016	Molina, S. J., Capani, F., & Guelman, L. R.	Noise exposure of immature rats can induce different age-dependent extra-auditory alterations that can be partially restored by rearing animals in an enriched environment	Artículo empírico Argentina	Investigar los aportes del ambiente enriquecido como neuroprotector en PA.
2016	Saraceno, G. E., Caceres, L. G., Guelman, L. R., Castilla, R., Udovin, L. D., Ellisman, M. H. et al.	Consequences of excessive plasticity in the hippocampus induced by perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Estudiar las consecuencias de la PA en el hipocampo, especialmente en relación con la neuroplasticidad.
2016	Soares, L. M., De Vry, J., Steinbusch, H. W., Milani, H., Prickaerts, J. & Weffort de Oliveira, R. M.	Rolipram improves cognition, reduces anxiety-and despair-like behaviors and impacts hippocampal neuroplasticity after transient global cerebral ischemia	Artículo empírico Brasil	Estudiar el efecto rotector del Rolipram en casos de isquemia cerebral global.
2017	Barkhuizen, M., Van den Hove, D. L., Vles, J. S., Steinbusch, H. W., Kramer, B. W. &	25 years of research on global asphyxia in the immature rat brain	Artículo teórico	Realizar una revisión de los modelos de PA en los últimos 25 años.

	Gavilanes, A. W.			
2017	Guida, F., Boccella, S., Iannotta, M., De Gregorio, D., Giordano, C., Belardo, C. et al.	Palmitoylethanolamide reduces neuropsychiatric behaviors by restoring cortical electrophysiological activity in a mouse model of mild traumatic brain injury	Artículo empírico Italia	Analizar la PEA como agente neuroprotector en PA.
2017	Herrera, M., Otero-Losada, M., Udovin, L., Kusnier, C., Kölliker-Frers, R., de Souza, W. et al.	Could perinatal asphyxia induce a synaptopathy? New highlights from an experimental model	Artículo teórico	Estudiar la sinaptopatía inducida por el modelo sueco de PA.
2017	Herrera-Marschitz, M., Perez-Lobos, R., Lespay-Rebolledo, C., Tapia-Bustos, A., Casanova-Ortiz, E., Morales, P. et al.	Targeting sentinel proteins and extrasynaptic glutamate receptors: a therapeutic strategy for preventing the effects elicited by perinatal asphyxia?	Artículo teórico	Investigar si los receptores de glutamato extrasinápticos y los marcadores de proteínas centinelas puede ser una estrategia terapéutica para proteger de los efectos de la PA.
2017	Holubiec, M. I., Romero, J. I., Blanco, E., Tornatore, T. L., Suarez, J., de Fonseca, F. et al.	Acylethanolamides and endocannabinoid signaling system in dorsal striatum of rats exposed to perinatal asphyxia	Artículo empírico Argentina	Estudiar los efectos de PA en el estriado murino y su neuroprotección con aciletanolamidas.
2018	Coronel Oliveros, C. & Pacheco Calderón, R.	Ontogenia del comportamiento en ratas en una batería de pruebas conductuales	Artículo empírico Venezuela	Estudiar el desarrollo ontogenético murino a través de estudios de conducta.
2018	Graham, E. M., Everett, A. D., Delpech, J. C., & Northington, F. J.	Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art	Artículo teórico	Realizar una revisión sobre los marcadores de injuria cerebral perinatal.
2018	Gupta, K.,	Study of clinical manifestations and	Artículo	Observación de

	Jadhav, J. & Shrikhande, D.	complications of perinatal asphyxia: Observational study	empírico India	complicaciones pediátricas a raíz de asfixia perinatal en un grupo de niños indios.
2018	Herrera M., Udovin L., Toro-Urrego N., Kusnier C., Luaces J. & Capani F.	Palmitoylethanolamide Ameliorates Hippocampal Damage and Behavioral Dysfunction After Perinatal Asphyxia in the Immature Rat Brain	Artículo empírico Argentina	Analizar la PEA como agente neuroprotector en PA en el hipocampo murino.
2019	Grupo Interinstitucional de las Naciones Unidas sobre la Estimación de la Mortalidad en la Niñez	Levels & Trends in Child Mortality: Report 2019. Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation.	Libro	Informar sobre las cifras mortalidad infantil en el año 2019.
2019	Herrera, M. I.	Neuroprotección en asfixia perinatal. Evaluación de los efectos psicobiológicos tempranos del tratamiento con Palmitoiletanolamida	Tesis doctoral sin publicar	Analizar la neuroprotección con PEA en casos de PA.
2019	Pugliese, V., Bruni, A., Carbone, E., Calabrò, G., Cerminara, G., Sampogna, G. et al.	Maternal stress, prenatal medical illnesses and obstetric complications: risk factors for Schizophrenia Spectrum Disorder, Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder	Artículo empírico Italia	Relacionar las complicaciones con obstétricas con posteriores desarrollos de esquizofrenia, bipolaridad y depresión mayor.
2020	Udovin L., Kobiec T., Herrera M. I., Toro-Urrego N., Kusnier C., Kölliker-Frers R. et al.	Partial Reversal of Striatal Damage by Palmitoylethanolamide Administration Following Perinatal Asphyxia	Artículo empírico Argentina	Analizar el efecto protector de la PEA en el estriado y sus conductas asociadas, en casos de PA.