

NEUROPROTECCIÓN CON PALMITOILETANOLAMIDA EN EL ESTRIADO, EN UN MODELO MURINO DE ASFIXIA PERINATAL

STRIATAL NEUROPROTECTION BY PALMITOYLETANOLAMIDE IN A MURINE MODEL OF PERINATAL ASPHYXIA

Tamara Kobiec* (1, 2) y Lucas D. Udovin* (1)

1 Instituto de Investigaciones Cardiológicas (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

2 Centro de Investigaciones en Psicología y Psicopedagogía (CIPP), Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina.

*Ambos autores tuvieron el mismo nivel de contribución.

Direcciones de mail: tamara.kobiec@gmail.com, lucas2304@hotmail.com

Resumen:

La asfixia perinatal (AP) es un síndrome clínico causado por la baja disponibilidad de oxígeno durante el parto, que se ha asociado con daño cerebral, siendo el estriado una de las estructuras más afectadas. La Palmitoiletanolamida (PEA) es un endocanabinoide con demostrados efectos neuroprotectores en lesiones cerebrales. Utilizando el modelo murino de asfixia perinatal de Bjelke, ratas neonatas fueron asfixiadas e inyectadas con PEA. Luego fueron perfundidas y se recogieron secciones del estriado para su análisis, que reveló que la AP produjo daño neuronal y cambios morfológicos evidenciados por una reducción en la inmunoreactividad de neurofilamentos fosforilados de peso molecular alto/medio (pNF-H/M), de la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y una disminución en el número de astrocitos (GFAP+). Estos resultados correlacionaron con una disminución en la expresión de los niveles proteicos de MAP-2 y pNF-H/M. El tratamiento con PEA restauró parcialmente el número de astrocitos GFAP+ y previno parcialmente la disminución de la inmunoreactividad de pNF-H/M y MAP-2. PEA también revirtió parcialmente la reducción de los niveles proteicos de MAP-2 y pNF-H/M causados por AP. El tratamiento con PEA atenuó el daño estriatal inducido por la AP, demostrando su posible función terapéutica en la prevención de trastornos del neurodesarrollo.

Palabras clave: Neuroprotección, estriado, asfixia perinatal, Palmitoiletanolamida.

Abstract:

Perinatal asphyxia (PA) is a clinical syndrome caused by low oxygen availability during delivery, which has been associated with brain damage, being the striatum one of the most affected structures. Palmitoylethanolamide (PEA) is an endocannabinoid with demonstrated neuroprotective effects in brain lesions. Using the experimental perinatal asphyxia murine model of Bjelke, neonatal rats were asphyxiated and injected with PEA. They were then perfused and sections of the striate were collected for analysis, which revealed that PA produced neuronal damage and morphological changes evidenced by a reduction in the immunoreactivity of phosphorylated neurofilaments of high / medium molecular weight (pNF-H / M), of the microtubule-

associated protein 2 (MAP-2) and a decrease in the number of astrocytes (GFAP +). These results correlated with a decrease in the expression of protein levels of MAP-2 and pNF-H / M. Treatment with PEA partially restored the number of GFAP + astrocytes and partially prevented the decrease in the pNF-H / M and MAP-2 immunoreactivity. PEA also partially reversed the reduction in protein levels of MAP-2 and pNF-H / M caused by PA. Treatment with PEA attenuated striatal damage induced by PA, demonstrating its possible therapeutic role in the prevention of neurodevelopmental disorders.

Keywords: Neuroprotection, striatum, perinatal asphyxia, Palmitoylethanolamide.

Área temática: Neuropsicología y Psicología Experimental.

INTRODUCCIÓN

La asfisia perinatal (AP) 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, 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 AP continúa siendo un problema de salud a nivel mundial, siendo un factor de riesgo para numerosos trastornos mentales y neurológicos (Herrera-Marschitz et al., 2014), incluyendo discapacidad intelectual y trastornos del espectro autista (Modabbeernia et al., 2016), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Perna & Cooper, 2012), esquizofrenia (Pugliese et al., 2019) y trastornos neurodegenerativos (Gupta et al., 2018)

La AP 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 AP el día esperado del parto sumergiendo a la crías en un baño término para simular una asfisia intrauterina. Este modelo ha permitido estudiar distintas alteraciones sinápticas que permitirían explicar los trastornos del neurodesarrollo asociados a la AP (Herrera et al., 2017). Las regiones del sistema nervioso central (SNC) más vulnerables a la AP son el hipocampo, el estriado y la corteza cerebral. En este caso se estudió el efecto de la AP sobre el estriado. Esta región cerebral, si bien tiene como funciones principales las locomotoras, también participa de las emociones y la cognición (Turlough Fitzgerald, Gruener & Mtui, 2012). De hecho, el daño provocado por la AP en el estriado ha sido asociado a trastornos mentales como la depresión, el trastorno obsesivo-compulsivo y las adicciones, entre otros (Ferré et al., 2007). Estos trastornos podrían deberse a la degeneración neuronal provocada por la PA en el estriado. Debido a que la mayor parte de los estudios se ha centrado en los efectos de la AP 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 AP en el estriado.

Hasta el momento no existe una estrategia terapéutica eficaz para disminuir o mejorar los efectos deletéreos producidos por la AP, 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 de fundamental relevancia. En este sentido, la Palmitoiletanolamida (PEA) se presenta como un posible neuroprotector en casos de AP. Este lípido endógeno presente en el cerebro 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 AP en el hipocampo y sus conductas asociadas a los 30 días postnatales de la rata (Herrera et al., 2016; Herrera et al., 2018).

La PEA, derivada de la reacción entre el ácido palmítico y la etanolamida, pertenece a la familia de las aciletanolamidas, las cuales son mediadores lipídicos endógenos presentes en considerable medida en los cerebros humano y murino. Las aciletanolamidas poseen propiedades homeostáticas endógenas frente al daño cerebral, regulando los procesos de inflamación crónica que resultan perjudiciales para el tejido nervioso. 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 exógena ha evidenciado las mencionadas propiedades en mayor medida que otras aciletanolamidas (Herrera et al., 2016). Estos resultados fueron encontrados en el hipocampo (Herrera et al., 2018). En cambio, en el presente trabajo se buscó estudiar estos mismos efectos en el estriado.

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 fase 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.

La ya mencionada fase latente es la etapa durante la cual una intervención terapéutica puede prevenir la lesión secundaria. Por este motivo, en esta fase se ofrece una ventana terapéutica, cuya duración en animales es de entre 6 y 15 horas. Es en este lapso de tiempo durante el cual se podría intervenir aplicando agentes neuroprotectores, que aún se encuentran en fase de experimentación animal. 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 fases, 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).

Esta investigación, además de enmarcarse en la Investigación Traslacional, también lo hace en el campo de la Psicología Comparada 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.

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.

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. En este sentido, la utilización de modelos animales de laboratorio permite investigar de manera más sencilla, ya que se pueden controlar todas las variables, con un menor costo económico y pudiendo además llevarse a cabo procedimientos que, por motivos éticos, no podrían realizarse en seres humanos.

El cerebro murino presenta grandes semejanzas con el cerebro humano y también, al tratarse de un animal mamífero, su modo de parto y posibilidad de AP es similar al humano. El modelo utilizado (Bjelke et al., 1991) ha demostrado ser efectivo para reproducir una situación de AP 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.

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. 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 el humano, mostrando la equivalencia entre los 30 días postnatales de la rata y la edad comprendida entre los 4 y 11 años de un ser humano, período durante el cual suelen hacerse manifiestos los trastornos del neurodesarrollo asociados a la AP (Semple et al., 2013). Es por esta razón que se ha tomado ese día para realizar las pruebas.

METODOLOGÍA

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.

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 es de 63 crías macho, divididas en cuatro grupos: ratas nacidas por parto natural inyectadas con vehículo (solución fisiológica) (grupo control+vehículo, n=13), ratas sometidas a AP e inyectadas con vehículo (grupo AP+vehículo, n=15), ratas nacidas por parto natural inyectadas con PEA (grupo control+PEA, n= 18) y ratas sometidas a AP e inyectadas con PEA (grupo AP+PEA, n=17).

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. Luego del destete, se colocaron entre tres y cuatro animales por jaula, del mismo grupo.

Inmunohistoquímica

En el día postnatal 30, a cuatro de las ratas (una por grupo), se le realizó una perfusión intracardiaca para fijar el tejido.. Una vez fijado el animal, se les extrajo el cerebro y se realizaron cortes coronales de secciones del estriado ($50\ \mu\text{m}$). Posteriormente a ello se obtuvieron imágenes a través de un microscopio óptico (Leyca) para poder realizar un análisis morfológico, es decir, estudiar cómo se distribuyen determinados marcadores en el tejido cerebral. Para ello se utilizaron los siguientes marcadores de daño neuronal y respuesta glial: neurofilamentos

fosforilados de alto/medio peso molecular (pNF-H/M), proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP+).

Una vez convertidas las imágenes de color a escala de grises, se calculó el porcentaje de área reactiva (inmunorreactividad) para pNF-H/M y MAP-2 utilizando el programa ImageJ (versión 1.41o.), y el número de astrocitos inmunorreactivos (GFAP+) se estimó manualmente.

Western Blot

El análisis a través de esta técnica se realizó utilizando cuatro animales por tratamiento y fue repetido tres 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.

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

RESULTADOS

La fosforilación de pNF-H/M como medida de la disfunción axonal y la degeneración celular se analizó mediante inmunotinción en el estriado murino en el día postnatal 30.

Se pueden observar cambios morfológicos en la sección estriatal obtenida por tinción inmunohistoquímica para pNF-H/M como consecuencia de la AP. 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 la 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 AP ($p < 0,0001$). Esta reducción se atenuó significativamente en el tratamiento con PEA ($p < 0,0001$). Sin embargo, el tratamiento con PEA no pudo alcanzar el estado del control ($p < 0,0001$). De acuerdo con estas observaciones morfológicas, la condición de nacimiento y el tratamiento fueron significativos ($F(1,8) = 122.3$, $p < 0.0001$; $F(1,8) = 8.002$, $p = 0.0222$; respectivamente) con respecto a la expresión de proteínas para pNF-H/M en el cuerpo estriado murino a los 30 días de vida posnatal (P30). La interacción entre el tratamiento y la condición de nacimiento también fue significativa ($F(1,8) = 10.18$, $p = 0.0128$). De acuerdo con el análisis post-hoc, se observó una reducción en la expresión proteica de pNF-H/M en el grupo de AP ($p < 0,0001$), que se atenuó después del tratamiento con PEA ($p = 0,0119$), aunque no fue capaz de alcanzar el estado del grupo control ($p = 0,0024$). El tratamiento con PEA en ratas del grupo control no tuvo un efecto significativo ni en el área reactiva y tampoco

en 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).

Dado que la AP 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 AP. De acuerdo con los resultados de 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 también fue significativa ($F(1,8) = 17711$, $p < 0.0001$). El análisis post-hoc reveló que el grupo AP presentó una disminución significativa en el porcentaje de área reactiva MAP-2 en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$). Esta reducción en el área reactiva de MAP-2 se mejoró después del tratamiento con PEA ($p < 0.0001$). Aunque el grupo AP+PEA no alcanzó valores similares al grupo de control, las diferencias no fueron significativas ($p = 0.0515$). 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. La condición de nacimiento y el tratamiento fueron factores significativos para los niveles de proteína MAP-2+ ($F(1,8) = 40.14$, $p = 0.0002$; $F(1,8) = 36.83$, $p = 0.0003$, respectivamente), y la interacción también fue 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 AP ($p < 0.0001$). Esta reducción en los niveles de expresión de la proteína MAP-2 se revirtió después del tratamiento con PEA ($p < 0.001$), alcanzando el estado de control ($p = 0.9974$). 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).

Se analizó la respuesta glial a la lesión por AP y el resultado del tratamiento con PEA en el estriado murino en el día postnatal 30, a través de la cuantificación de GFAP+ (astrocitos inmunoreactivos para GFAP) y su expresión proteica.

Cuando se cuantificó el número de astrocitos inmunorreactivos (GFAP+), el ANOVA de dos vías indicó que la condición de nacimiento y el tratamiento fueron estadísticamente significativos ($F(1,56) = 58.73$, $p < 0.0001$; $F(1,56) = 16.44$, $p = 0.0002$, respectivamente), así como su interacción ($F(1,56) = 19.4$, $p < 0.0001$). El análisis post-hoc reveló que el grupo de AP presentó una disminución significativa en el número de astrocitos inmunoreactivos (GFAP+) en comparación con el grupo de control ($p < 0.0001$). Esta reducción en los astrocitos inmunorreactivos (GFAP+) se revirtió parcialmente después del tratamiento con PEA ($p < 0.0001$). Aunque el grupo AP+PEA no alcanzó valores similares al grupo control, las diferencias no fueron significativas ($p = 0.0628$). Además, el número de astrocitos inmunorreactivos (GFAP+) presentó valores similares entre el grupo control tratado con vehículo y el grupo control tratado con PEA ($p = 0.9946$). Sin embargo,

no hubo diferencias significativas cuando se analizó la expresión proteica de GFAP en los 4 grupos experimentales. El ANOVA de dos vías reveló que las condiciones de nacimiento y el tratamiento no fueron significativas ($F(1,8) = 0.04421$, $p = 0.8387$; $F(1,8) = 0.01157$, $p = 0.917$, respectivamente) y tampoco lo fue ninguna de sus interacciones ($F(1, 8) = 0.002636$, $p = 0.9603$).

DISCUSIÓN

En este trabajo, se demuestra por primera vez que el tratamiento con PEA durante la primera hora de vida restauró parcialmente el daño dendrítico (reducción de MAP-2), atenuó la lesión axonal (reducción de pNF-H / M) y revirtió parcialmente el número bajo de astrocitos (células GFAP+) inducidas por AP en ratas P30 del estriado. De acuerdo con estos resultados, varios estudios apoyaron los efectos protectores de la PEA en modelos animales para trastornos neurodegenerativos y trastornos de HI (Fernandez-Lopez et al., 2013; Herrera et al., 2018). Estos estudios respaldan la evidencia del papel protector de la PEA contra el daño neuronal en varias lesiones cerebrales, incluido el daño cerebral inducido por la AP.

MAP-2 y pNF-H / M son biomarcadores usados comúnmente para evaluar la extensión y distribución de la degeneración neuronal dendrítica y axonal del citoesqueleto inducida por hipoxia-isquemia (HI). En este estudio, observamos que la AP indujo una disminución marcada tanto en los niveles de proteína como en la inmunoreactividad de MAP-2 en el estriado de rata en P30. De acuerdo, estudios previos informaron una reducción significativa en el área reactiva y la expresión proteica de MAP-2 en P30 en el estriado (Saraceno et al., 2012) e hipocampo (Herrera et al. 2018), y posteriormente en P40 en el hipocampo (Saraceno et al., 2010) de ratas. 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.

El presente estudio también muestra una disminución significativa de los niveles de proteína y la inmunoreactividad de pNF-H / M en el cuerpo estriado en respuesta a AP en P30. Esta reducción de pNF-H / M podría estar relacionada con un cambio en la función de la calpaína, una proteasa dependiente de calcio ampliamente distribuida en el cerebro, que podría activarse durante la hipoxia, lo que lleva a la degradación de los neurofilamentos. De acuerdo, Drobyshevsky y colaboradores (2007) mostraron una reducción en el volumen y la pérdida de neurofilamentos fosforilados en el cuerpo calloso y la cápsula interna en un modelo animal de parálisis cerebral.

Un hallazgo intrigante en este estudio fue la observación de una disminución marcada de las células astrogliales sin cambios en los niveles de proteína de GFAP inducida por AP en el estriado de rata en P30. Estudios previos de nuestro grupo informaron que la AP desencadena astrogliosis en el estriado en P30 (Holubiec et al., 2017) y en ratas de 6 meses de edad. Incluso cuando estamos en P30, nuestros resultados actuales pueden resultar controvertidos; las observaciones anteriores solo se basaron en la inmunolocalización GFAP de una región específica, el cuerpo estriado dorsal (Holubiec et al., 2017). En el presente trabajo realizamos tanto la inmunolocalización (área reactiva) como la técnica Western blot para GFAP de todo el

cuerpo estriado. Además, estos resultados contrastantes pueden evidenciar un papel más complejo y bimodal protector o perjudicial de los astrocitos en la isquemia neonatal. Es posible especular que la inmunorreactividad reducida de GFAP + en el estriado de ratas de treinta días observada en este estudio podría deberse a mecanismos de muerte astrogial inducidos por la AP. Sin embargo, para aclarar este punto será necesario evaluar la respuesta de los astrocitos en diferentes regiones estriatales e investigar biomarcadores gliales y apoptóticos adicionales.

En conclusión, este estudio mostró que el tratamiento durante la primera hora de vida con PEA (10 mg / kg) fue capaz de atenuar el daño dendrítico y axonal neuronal (indicado por la disminución de los marcadores MAP-2 y pNF-H / M, respectivamente), así como el número reducido de astrocitos (células GFAP +) inducidas por AP en el estriado de rata en P30. Junto con una gran cantidad de estudios previos, este trabajo refuerza la evidencia de los efectos neuroprotectores de la PEA contra la HI en el estriado, una estructura cerebral vulnerable a las lesiones de la HI, y nos alienta a estudiar más a fondo los mecanismos involucrados en este efecto.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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.
- Drobyshevsky, A., M. Derrick, et al. (2007). White matter injury correlates with hypertonia in an animal model of cerebral palsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(2), 270-281.
- Fernandez-Lopez, D., I. Lizasoain, et al. (2013). Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sci* 3(3),1043-1059.
- Ferré, S., Diamond, I., Goldberg, L., Yao, L. 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.
- 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-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, 603–27.
- Herrera-Marschitz, M., Neira-Pena, T., Rojas-Mancilla, E., Espina-Marchant, P., Esmar, D., and 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.
- 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.
- 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.
- Perna, R., & Cooper, D. (2012). Perinatal cyanosis: long-term cognitive sequelae and behavioral consequences. *Applied neuropsychology: Child*, 1(1), 48–52.
- Pugliese, V., Bruni, A., Carbone, E., Calabrò, 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.
- Saraceno, G. E., M. V. Ayala, et al. (2012). Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton. *Synapse* 66(1): 9-19.
- Saraceno, G. E., M. L. Bertolino, et al. (2010). Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Exp Neurol* 223(2), 615-622.
- 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.
- Turlough Fitzgerald, M. J., Gruener, G., & Mtui, E. (2012). *Neuroanatomía clínica y neurociencia*, Barcelona: Elsevier Saunders, 342-351.