

**MAESTRIA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA
(BMM)**

**MODIFICACIONES INDUCIDAS POR LA
ASFIXIA PERINATAL EN EL CEREBELO DE
RATA. NEUROPROTECCIÓN POR
ESTRÓGENOS**

AUTORA: DRA. VERÓNICA CAMPANILLE

DIRECTORA: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CASTILLA LOZANO

CO-DIRECTOR: DR. FRANCISCO CAPANI

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una Tesis es difícil incluso muchos prefieren dejarla para otro momento, ya sea por falta de tiempo, inspiración, entusiasmo, porque no dominan bien el tema de la misma o porque simplemente no es su prioridad. Pero para aquellos que decidimos hacerla, a pesar de los problemas presentados, incluso por segunda vez, tuvimos la fortuna de no estar solos.

En primer lugar mi profundo agradecimiento a la Directora de La Maestría Prof. Dra. Rosa Wainstok quien además de su aporte científico y docente, por la contribución económica para la realizar la Tesis.

Por otra parte tuve la oportunidad de ser aceptada en el Laboratorio donde todos me recibieron como como si fuera una más del grupo. Quiero agradecer especialmente a mis Directores de Tesis, Rocío Castilla Lozano y Francisco Capani. Rocío nunca dejó de asesorarme y conducirme en este trabajo con sus conocimientos y experiencia de manera permanente a lo largo de la elaboración de la Tesis.

Quiero agradecer también a la ayuda brindada por Ezequiel Saraceno por sus conocimientos en la hipoxia del hipocampo.

Por último quiero dar las gracias a todos los miembros del laboratorio que me brindaron su ayuda incondicional en todo momento.

Gracias

INDICE

- 1. INTRODUCCIÓN, Página 14**
- 1.1 Generalidades, Página 14**
- 1.2 Asfixia Perinatal, Página 14**
 - 1.2.1 Mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por la asfixia, Página,14-15**
 - 1.2.2 Excitotoxicidad y estrés oxidativo, Página 15-16**
 - 1.2.3 Expresión génica inducida por la asfixia, Página 16**
 - 1.2.4 Gliosis reactiva, Página 17**
 - 1.2.5 Mecanismos de muerte celular involucrados en la AP, Página 17-18**
 - 1.2.6 Modelo de H-I perinatal murino, Página 18-20**
- 1-3 El cerebelo, Página 20**
 - 1-3.1 Características generales, Página 20**
 - 1.3.2 Anatomía, Página 20**
 - 1.3.3. Descripción externa, Página 20**
 - 1.3.4 Visión superior del cerebelo humano, Página 21**
 - 1.3.5 Cara inferior, Página 21-22**
 - 1.3.6 Cara anterior, Página 22**
 - 1.3.7 Divisiones, Página 23**
 - 1.3.8 División Morfológica, Página 23**
 - 1-3-9 Filogenética, Pàgina 24**
 - 1.3.10 Representación topográfica del cuerpo, Pàgina 24-25**
 - 1-3-11 Corteza Cerebelosa. Organización celular específica, Pàgina 25-28**
 - 1-3-12 Conexión del cerebelo, Página 28**
 - 1.3.13 Desarrollo prenatal del Cerebelo, Página 28-30**
 - 1-3. 14 Desarrollo postnatal, Página 31-32**
- 1.4 Función del Cerebelo, Página 32**
 - 1.4.1 Participación del cerebelo en la regulación de las funciones motoras, Página 32-33**
 - 1.4.2 Cerebelo en el aprendizaje motor y no motor, Pàgina 33**

- 1.4.3 Cerebelo y lenguaje, Página 33
- 1.4.4 Cerebelo y habilidades visuoespaciales, Página 33
- 1.4.5 Cerebelo, aprendizaje y memoria, *Página 34*
- 1.4.6 Cerebelo y atención, Página 34-35
- 1.4.7 Funciones ejecutivas y cerebelo, Página 35
- 1-5 Alteraciones en el cerebelo, Página 35-36
- 1.5.1 Alteraciones en el cerebelo como consecuencia de una AP, Página 36
- 1.6 Estrategias Terapéuticas, Página 37
- 1.6.1 El E2 como herramienta neuroprotectora, Página 37-38
- 1.6.2 Receptores de estrógeno, Página 38-39
- 1.6.3 Mecanismos de acción del E2, Página 39
- 1.6. 4 Mecanismos de acción del E2 iniciados en el núcleo, Página 40
- 1.6.5 Mecanismos de acción del E2 iniciados en la membrana, Página 41
- 1.6.6 Interacción con factores tróficos, Página 41-42
- 1.6.7 Papel neuroprotector del E2 en el tratamiento de la Asfixia Perinatal, Página 43-44
- 1.6.8 Campo de aplicación de los resultados, Página 44

- 1. 7 HIPÓTESIS, Página 46

- 2. OBJETIVOS, Página 48
- 2.2.1 Objetivos Generales, Página 48
- 2.2.2 Objetivos Específicos, Página 48

- 3. MATERIALES Y MÉTODOS, Página 50
- 3.1 Animales, Página 50
- 3.1.1 Inducción a la Hipoxia Isquemia, Página 50-51
- 3.1.2 Protocolo de neuroprotección, Página 51-52
- 3.2 Análisis celular y subcelular, Página 52
- 3.2.1 Exámenes histológicos, Página 52
- 3.2.2 Inmunohistoquímica, Página 53-55

- 3.2.3 Azul de Toluidina, Página 55**
- 3.2.4 Fotografía y análisis de imágenes, Página 55-56**
- 3.3 Análisis molecular, Página 56**
 - 3.3.1 Procesamiento de las muestras, Página 56**
 - 3.3.2 Cuantificación de proteínas, Página 57**
 - 3.3.3 Western blot, Página 57-60**
- 3.4 Análisis estadístico, Página 60**

- 4. RESULTADOS, Página 62**
 - 4.1 Determinación del grosor de las capas cerebelares, Página 62**
 - 4.1.1 Espesor de la capa Molecular, Página 62-65**
 - 4.1.2 Número de células en la capa molecular, Página 65-70**
 - 4.1.3 Capa granular interna, Página 68**
 - 4.1.3.1 Espesor de la capa granular interna, Página 68-76**
 - 4.2 Las células de Purkinje, Página 76-81**
 - 4.3 Morfología Dendrítica, Página 82-84**
 - 4.4 Los astrocitos, Página 84-89**
 - 4.5 Apoptosis, Página 90**
 - 4.6 Expresión de los receptores α y β en el cerebelo, Página 91**

- 5. DISCUSIÓN, Página 93-109**

- 6. CONCLUSIONES, Página 111-112**

- 7. PERSPECTIVAS FUTURAS, Página 114**

- 8. BIBLIOGRAFÍA, Página 116-138**

RESUMEN

La asfixia perinatal (AP) (incidencia 1-5000 nacidos vivos) es una complicación obstétrica asociada a una alta tasa de morbimortalidad. El conocimiento de los mecanismos involucrados en las alteraciones causadas por la AP permitirá diseñar terapias preventivas o paliativas de esta condición. El cerebelo es vulnerable a la hipoxia en recién nacidos por su rápido crecimiento en este período y puede dar lugar a alteraciones de sus funciones, incluyendo el control del motor y cognitivo y procesos afectivos. Previamente, utilizando un modelo de AP murino en nuestro laboratorio caracterizamos las alteraciones hipocámpales a largo plazo; sin embargo, las modificaciones en cerebelo no han sido completamente dilucidadas. Por tal motivo estudiamos las alteraciones morfológicas de los cerebelos (10-12 por grupo) de ratas adultas (120 días) que sufrieron AP y el efecto de un tratamiento tardío con Estradiol (E2) como posible terapia neuroprotectora. Se analizaron los lóbulos cerebelares de secciones sagitales por inmunohistoquímica. Observamos que el número de células de Purkinje no se alteró en los animales AP, pero que presentaban mayor porcentaje de células con tinción anormal para Calbindina así como por tinción con Azul de Toluidina. Se observa además una configuración espacial desorganizada de la capa de células de Purkinje con aglomerado de las mismas en diversas regiones. A nivel de la capa molecular, se detectó un aumento del espesor de la misma en los animales asfícticos así como una edematización de las dendritas de las PC, reflejadas en el incremento del porcentaje del área MAP2 reactiva. Con respecto a la capa granular se observó un aumento en el espesor de la misma en los animales AP. Tanto en esta capa como en la molecular se observó un incremento de gliosis reactiva (astrocitos y glia de Bergmann respectivamente) en cerebelos de animales AP determinada por un aumento del porcentaje del área GFAP+. Dicho aumento fue corroborado por Western blot. El tratamiento con E2 no produjo cambios significativos entre los animales AP y los controles. En conclusión, este trabajo muestra los efectos a largo plazo de la AP en la estructura del cerebelo, que podrían estar involucrados en la patogénesis de los déficits cognitivos, como se observa en los animales y los seres humanos. El E2 no fue un tratamiento efectivo para revertir los cambios

producidos por la AP en las ratas probablemente por el tipo de receptor de E2 expresado en el cerebelo y al tiempo analizado.

Palabras claves: asfixia perinatal, cerebelo, alteraciones morfológicas, estradiol.

SUMMARY

Perinatal asphyxia (AP) (1-5000 incidence live births) is an obstetric complication associated with a high rate of morbidity and mortality.

The knowledge of the mechanisms involved in the disturbances caused by AP will allow the design of preventive or palliative therapies.

The rapidly growing neonatal cerebellum is vulnerable to hypoxia and may suffer functional alterations, including motor, cognitive and affective processes.

We previously characterized hippocampal alterations using a murine model of AP; however, cerebellar alterations have not been completely described. Therefore, we studied morphological cerebellar alterations in adult rats (120 days old, 10-12 per group) suffering AP, and a later Estradiol (E2) treatment as a possible neuroprotective therapy. Sagittal sections of cerebellar lobes were analyzed by immunohistochemistry. The total number of Purkinje cells (PCs) remained constant in AP animals, but showed a higher percentage of abnormal cells with both calbindin toluidine blue staining. Purkinje cell layer exhibited a disorganized spatial configuration with PC clusters in some regions and gaps in others. At molecular layer level, an increased thickness was detected in asphyctic animals, together with the presence of edema in their dendrites, evidenced by an increased percentage of MAP2-reactive area. With respect to the granular layer, an increment in thickness was also observed in AP animals. In turn, an increase in reactive gliosis in both the granular and molecular layers (Bergmann glia and astrocytes, respectively) was observed in cerebella of AP animals, evidenced by an increased percentage of GFAP+ area and confirmed by Western blot. Finally, E2 treatment did not significantly improve alterations in AP animals. In conclusion, this study shows the long-term effects of AP in the cerebellar structure, which could be involved in the pathogenesis of cognitive deficits observed in animals and

humans. E2 treatment failed to reverse changes produced by AP in rats, probably because of the type of estrogen receptor expressed in the cerebellum and the time analyzed.

Keywords: perinatal asphyxia, cerebellum, morphological alterations, estradiol.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

En el período de tesis parte de los resultados fueron publicados en la siguiente revista internacional con referato:

PUBLICACIONES

-LONG LASTING CEREBELAR ALTERATIONS AFTER PERINATAL ASPHYXIA IN RATS. **Verónica Campanille**, G. Ezequiel Saraceno, Stéphanie Riviere, Tamara Logica, Rodolfo Köliker, Francisco Capani, Rocío Castilla. 2015. Brain Research Bulletin, 116; 57-66.

Además, durante el período de tesis presentamos los resultados obtenidos, ya sea pertinentes a este trabajo así como aquellos obtenidos en colaboración con otros investigadores del laboratorio en las siguientes reuniones científicas:

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

-ALTERACIONES CEREBELARES A LOS 120 DÍAS EN RATAS QUE SUFRIERON ASFIXIA PERINATAL **Campanille, Verónica**; Saraceno, Gustavo Ezequiel; Logica Tornatore, Tamara; Kolliker- Fres, Rodolfo; Capani, Francisco; Castilla, Rocío. Congreso de Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas (SAIC) 2014, Mar del Plata, Argentina.

-EFECTOS DEL CLORURO DE COBALTO EN EL ÁREA CA3 DEL HIPOCAMPO SOBRE UN MODELO MURINO DE HIPOXIA-ISQUEMIA Logica Tornatore, Tamara, Saraceno, Ezequiel; **Campanille, Verónica**; Romero, Juan Ignacio; Holubiec, Mariana; Kolliker- Fres, Rodolfo, Capani, Francisco; Castilla, Rocío. Mendoza. Argentina 2014. III Congreso Argentino de Microscopía. Sociedad Argentina de Microscopía (SAMIC)

CHRONIC CEREBELLAR ALTERATIONS CAUSED BY PERINATAL ASPHYXIA. ESTRADIOL AS A POSSIBLY NEUROPROTECTIVE THERAPY. **Verónica Campanille**, G. Ezequiel. Saraceno, Stéphanie Rivière, Tamara Logica, Rodolfo

Kölliker, Francisco Capani and Rocío Castilla. 2015 XIII CIACEM - XIII Interamerican Microscopy Congress & XVI Venezuelan Congress for Microscopy and Microanalysis (XVI CONVEMI). Isla Margarita, Venezuela.

ABREVIATURAS

Asfixia perinatal (AP)

Hipoxia isquemia (HI)

Oxido nítrico (NO)

Oxido nítrico sintasa (NOS)

Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Acido desoxirribonucleico (ADN)

Factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF-1)

Sistema nervioso central (SNC)

Células de Purkinje (PCs)

Capa granular externa (CGE)

Capa granular interna (CGI)

Resonancia magnética funcional (RMf)

Tomografía por emisión de positrones (PET)

Estradiol (E2)

Receptores de estrógenos (ERs)

Elemento de respuesta a estrógenos (ERE)

Fostatidilinositol-3 quinasa (PI3K)

Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Kinasa regulada por señales extracelulares (ERK)

Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)

Factor de crecimiento nervioso (NGF)

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Neurotrofina 3 (NT-3)

Encefalopatía hipóxico isquémica (EHI)

N-metil-D-aspartato (NMDA)

Acido- γ -aminobutírico (GABA)

Purkinje-olivo-dentado (PODN)

Trastornos del espectro autista (TEA)

Tomografía axial computada (TAC)

Resonancia nuclear magnética de cerebro (RNMC)

Tomografía simple por emisión de fotón único (SPECT)

Magnetoencefalografía (MEEG)

Calbindin-D28 K (CALB)

INTRODUCCION

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

1.2 Asfixia Perinatal

La hipoxia-isquemia (HI) cerebral, tanto durante el momento del nacimiento como la desencadenada por un accidente cerebrovascular en el adulto, es un importante problema de salud a nivel mundial, no sólo porque puede producir muerte sino por las secuelas que deja a largo plazo. En la actualidad, es la primera causa de alteraciones neurológicas y la tercera causa de muerte en los países desarrollados (Romero J R y col, 2007).

El cerebro en desarrollo es particularmente vulnerable al estrés materno y a agresiones ambientales antes y después del nacimiento. Entre estos factores de estrés, la hipoxia sufrida como consecuencia de la asfixia perinatal (AP) aparece como el factor más importante (McEwen B S. ,2007; Kinney D K .y col., 2008; Lawn J E y col., 2005). La AP es un trastorno que puede ser causado por diferentes procesos, entre ellos alteraciones en el intercambio de gases en la placenta y falla pulmonar del feto, causando falta de oxígeno (hipoxia) o falta de perfusión (isquemia) hacia distintos órganos del cuerpo durante el periodo perinatal.

Se considera que el periodo perinatal comienza en la vigésimo octava semana de gestación y termina el séptimo día post parto (Carrera J M y col., 2010).

La AP tiene una incidencia de 2-4 por cada 1000 nacidos vivos y se asocia a una alta morbimortalidad a corto plazo y a distintos tipos de enfermedades neurológicas a largo plazo, tales como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, epilepsia, retraso mental, parálisis cerebral, alteraciones auditivas y visuales (Petito C K y col. 1984; Choi D. y col. 1990; du Plessis A J y col, 2002).

1.2.1 Mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por la asfixia.

Cuando un organismo es sometido a un estado de HI durante cierto período de tiempo, las células disparan mecanismos de defensa que pueden llevar a una degeneración celular en caso de que persista la falta de oxígeno. Cuando los

tejidos sufren los efectos de una disminución de flujo sanguíneo se produce consecuentemente una reducción en la disponibilidad de oxígeno y de glucosa, siendo, como se mencionó antes, el tejido nervioso uno de los más dañados.

Un estado severo de HI deprime los centros respiratorios, llevando a una anoxia-isquemia, en la cual además de la falta de oxígeno y nutrientes, se agrega una gran acumulación de productos metabólicos que desencadenan mecanismos de muerte celular (Cervos-Navarro J y col., 1991).

El conocimiento de la fisiopatogenia de la AP aumentó considerablemente en las tres últimas décadas como consecuencia de las observaciones clínicas y de la experimentación en investigación básica mediante la utilización de modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Vannucci R C y col., 1990; Johnston M V y col., 2000). A partir de estos progresos, se ha podido identificar la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como los principales mecanismos involucrados en el daño neuronal producidos por la AP.

1.2.2 Excitotoxicidad y estrés oxidativo

El proceso HI en determinadas áreas del cerebro en desarrollo conduce a un daño cerebral mediado por la activación de diversos agentes citotóxicos y de vías de muerte celular (Barks J D y col., 1992; Martin L J y col., 1997; Johnston MV, 2001). El evento primario que dispara un evento HI es la inhibición de la fosforilación oxidativa acompañada de un rápido descenso en los niveles de ATP, que provoca a su vez una disminución de la actividad de la bomba Sodio/Potasio (Na^+/K^+) ATPasa, conduciendo a la despolarización de la membrana celular (Martin R L y col., 1994; Silver I A y col., 1997). La pérdida de los gradientes iónicos neuronales se asocia con un incremento importante y sostenido de las concentraciones extracelulares de glutamato y otros neurotransmisores (Choi D W, 1987; Capani F y col., 1997). El exceso de glutamato evoca potenciales despolarizantes en las neuronas post sinápticas pudiendo conducir a la apertura de los canales de Calcio dependientes de voltaje, con el consecuente incremento de los niveles intracelulares de este ión, que desencadena, a su vez, una serie de desajustes metabólicos conocidos como proceso excitotóxico, con un impacto

negativo en el destino celular (Choi D W, 1995; Orrenius S y col., 2003). Este proceso incluye la liberación de óxido nítrico (NO, *Nitric oxide*) por activación de la óxido nítrico sintasa (NOS, *Nitric oxygen synthase*) y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) (Capani F y col., 2001a, 2003), principalmente mitocondriales, que inducen la activación de lipasas, fosfolipasas, proteasas y proteínas quinasas.

La reoxigenación posterior a un evento HI genera una sobreproducción de ROS en las mitocondrias y un consumo de los antioxidantes endógenos, que puede conducir a un dramático incremento en la concentración de ROS intracelular (Sugawara T y col., 2004). El desequilibrio entre la producción de estas especies reactivas y la capacidad de un sistema biológico de detoxificarlas se denomina estrés oxidativo (Droge W, 2002), y puede desembocar en una disfunción metabólica e incluso en la muerte celular mediante un incremento en la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y los daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Martin S S y col., 2005; Markesbery W R y col., 2007).

1.2.3 Expresión génica inducida por la asfixia

El oxígeno molecular es un componente esencial para la producción de ATP, fuente principal de energía metabólica para todas las células eucariontes, por ello, lo largo de la evolución se ha desarrollado la capacidad de responder a un proceso HI regulando la transcripción de genes involucrados en la mejora de la perfusión tisular y la generación anaeróbica de ATP a través de la glucólisis. Estos genes son principalmente regulados por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1, *Hypoxic inducible factor*). Sin embargo, se ha demostrado que existen varios factores de transcripción sensibles a la AP que contribuyen a formar un complejo transcripcional durante esta condición fisiopatológica (Cummins E P y col., 2005).

1.2.4 Gliosis reactiva

Cuando se produce un daño en el sistema nervioso, la glía reacciona cambiando su estado normal al de *glía reactiva*, precediendo por lo general la activación microglia a la astrogial.

La gliosis reactiva es la alteración más frecuente de los astrocitos y representa una reacción inespecífica. Consiste en una proliferación celular con hipertrofia de la célula, a veces en forma de gemistocitos, expresan más filamentos intermedios y terminan con la producción de fibras gliales. Estas fibras pueden constituir una cicatriz glial que representa una forma de reparación propia del tejido nervioso.

La reactividad glial tiene inicialmente como objeto el reparar daños y normalizar los niveles de nutrientes y neurotransmisores; sin embargo, termina por generar lesiones secundarias que pueden llegar a hacer crónica la patología: provoca muerte neuronal secundaria, ampliando la zona lesionada hasta el punto de verse afectados grupos neuronales que habían quedado intactos hasta ese momento.

1.2.5 Mecanismos de muerte celular involucrados en la PA

Luego de un proceso HI, la muerte celular se caracteriza por un retraso temporal entre el momento de la injuria y la manifestación del daño celular (Balduini W y col., 2004), el cual depende de la intensidad de la injuria y de la región del sistema nervioso central (SNC) afectada, manifestándose, en algunos casos, algunos días o incluso semanas más tarde (Kirino T y col., 1984; Du C y col., 1996). La evidencia acumulada indica que la muerte celular inmediata a un proceso HI suele ser necrótica (daño primario) (Northington F J y col., 2001), en tanto que la muerte celular retrasada en el tiempo, que ocurre horas o días después (daño secundario) es apoptótica y es producida por una serie compleja de eventos bioquímicos y moleculares altamente regulados (Leist M y col., 1998). Sin embargo, se ha determinado en muchos paradigmas experimentales que la apoptosis es también responsable de una proporción significativa de pérdida

celular a corto plazo, luego de un evento HI (Delivoria-Papadopoulos M y col., 2000; Zhu C y col., 2007).

La figura 1 resume estos eventos de respuesta del sistema en relación al tiempo post injuria.

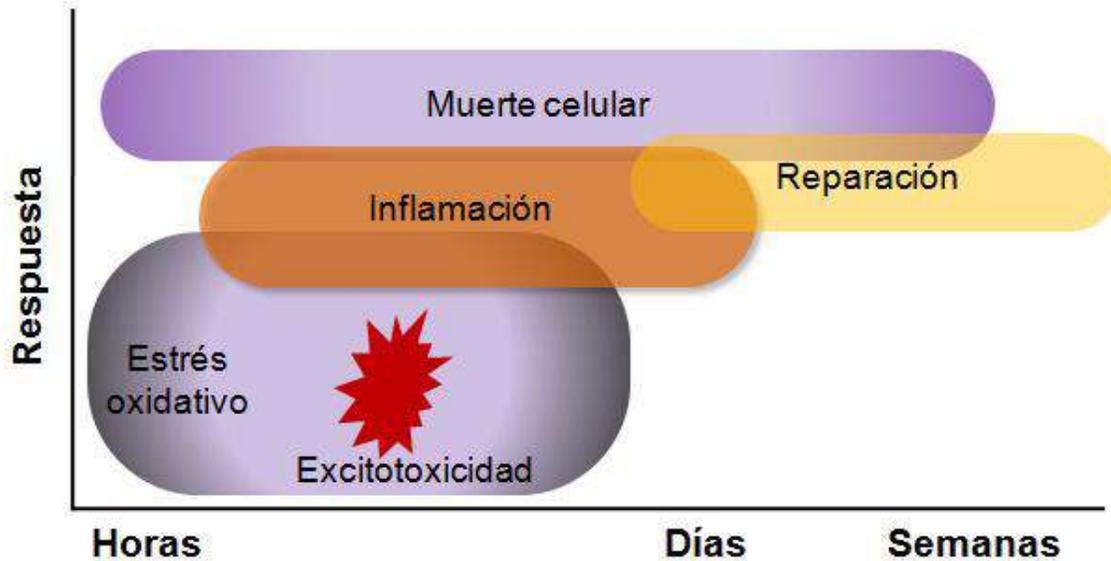


Figura 1. Mecanismos de injuria cerebral en el recién nacido a término. El estrés oxidativo y la excitotoxicidad, a través de su cascada de señalización río abajo, producen un proceso inflamatorio y la reparación del tejido. La muerte celular comienza inmediatamente y continúa durante días o semanas. Modificado de Ferriero D M , 2004.

1.2.6 Modelo de H-I perinatal murino

Como consecuencia de las diferencias funcionales y de desarrollo entre el cerebro neonatal y el adulto, se hace difícil extrapolar los datos obtenidos en adultos a la condición neonatal. Por esta razón, en los últimos 40 años se han desarrollado diversos modelos de HI en mamíferos para el estudio de la AP (Northington F J , 2006). El modelo murino de HI global, reproduce de manera adecuada esta patología y permite estudiar cambios celulares, subcelulares, bioquímicos y moleculares a corto y largo plazo de manera no invasiva. El mismo ha sido utilizado en los últimos años en nuestro laboratorio. Se trata de un modelo de AP global en ratas *Sprague Dawley* (Capani F y col., 1997, 2001a y b, 2003,

2009; Saraceno G E y col., 2010, 2011; Galeano P y col., 2011). En nuestro diseño experimental, los úteros de ratas preñadas obtenidos mediante histerectomía son colocados en un baño termostático a 37°C durante 10, 15 y 19 minutos. Concluido el período de asfixia, se procede a la remoción, resucitación y acondicionamiento de los fetos, con posterior ligación del cordón.

Utilizando el modelo de AP mencionado anteriormente se pudo dilucidar que el cerebelo, las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, el cuerpo estriado, las capas II, III y VI de la corteza cerebral, y la retina son algunas de las áreas del SNC que muestran mayor vulnerabilidad ante la injuria (Ginsberg M , 1995; Osborne N N y col., 2004; Saraceno G E y col., 2010, 2011).

En estudios a corto plazo (animales entre 24 horas y 7 días) se observó principalmente un incremento de la mortalidad, asociada probablemente al aumento de los niveles de glutamato (Choi D W y col.,1990) y a la liberación de NO (Loidl C F y col. 1998), desencadenando un aumento en la producción de ROS (Capani F.y col., 2001). Estos mecanismos de defensa disparados en un primer momento, cuando se exacerbaban, pueden llevar a una degeneración celular. Esta respuesta a la injuria cerebral provoca cambios dramáticos en la expresión génica, sobreexpresando factores de transcripción como NF-kB, HIF-1 y AP-1. Este aumento provoca alteraciones en el sistema que tienen el objetivo de compensar los daños ocasionados por la injuria inicial.

Estudios realizados en hipocampo y neocórtex a mediano plazo (30 días post AP), revelaron alteraciones en el número de espinas dendríticas, mientras que a largo plazo (120 días post AP) se observó la presencia de gliosis reactiva (indicador de injuria en el SNC) y cambios en el citoesqueleto neuronal (marcadores de neurodegeneración). Por otro lado, las ratas de seis meses que fueron sometidas a una asfixia severa (20 min) mostraron alteraciones crónicas como una disminución en la liberación de dopamina, aspartato y glutamato en el estriado (Loidl C F y col., 1994), aumento de NO en estriado y corteza (Capani F. y col.,1997) y un incremento en la producción ROS en neocórtex y neocórtex (Capani F. y col., 2003). A nivel celular y subcelular se han descrito cambios en el

citoesqueleto astrocitario así como en los neurofilamentos pesados en axones y en las densidades post-sinápticas en el neocórtex (Cebal E. y col.,2006).

Sin embargo, poco se sabe aún sobre las alteraciones que sufre el cerebelo a largo plazo. Es por esto que el presente trabajo se centrará en el estudio de los cambios celulares, y moleculares en el cerebelo a los 120 días post AP. Es preciso destacar que la maduración de los contactos sinápticos se produce a los 30 días post natales.

1.3 El cerebelo

Como se dijo antes, en este trabajo estudiaremos el efecto crónico de la AP sobre el cerebelo, razón por la cual es importante conocer la estructura de esta región del SNC.

1.3.1 Características generales

1.3.2 Anatomía

El cerebelo se encuentra pegado a la pared posterior del tronco del encéfalo y está incluido dentro de un estuche osteofibroso -la celda cerebelosa o subtentorial- formado por una pared superior y otra inferior. La pared superior está constituida por una prolongación de la duramadre denominada tienda del cerebelo y la pared inferior la forman las fosas cerebelosas del hueso occipital recubiertas por la duramadre. Normalmente, el cerebelo de un varón adulto pesa unos 150 g y mide 10 cm de ancho, 5 cm de alto y 6 cm en sentido antero-posterior. En los niños la relación entre el volumen del cerebelo y del cerebro es de 1 a 20, mientras que en adultos es de 1 a 8.

1.3.3 Descripción externa

El cerebelo está conformado por dos hemisferios separados por un vermis, tiene forma de cono truncado aplastado en sentido supero-inferior en el cual se pueden diferenciar tres caras: superior, inferior y anterior.

1.3.4 Visión superior del cerebelo humano..

La cara superior tiene la forma de un tejado con dos vertientes laterales y está en contacto con la tienda del cerebelo (ver Figura 2). En la parte central, presenta una elevación alargada en sentido antero-posterior que recibe el nombre de vermis superior. A ambos lados del vermis superior se extienden dos superficies inclinadas y casi planas que constituyen las caras superiores de los hemisferios cerebelosos. La cara superior está separada de la cara inferior por el borde circunferencial del cerebelo. En una vista superior, el borde circunferencial presenta dos escotaduras: una anterior en relación con el tronco del encéfalo, y otra posterior en relación con la hoz del cerebelo. El borde circunferencial del cerebelo está recorrido longitudinalmente por una fisura profunda denominada fisura horizontal o surco circunferencial.

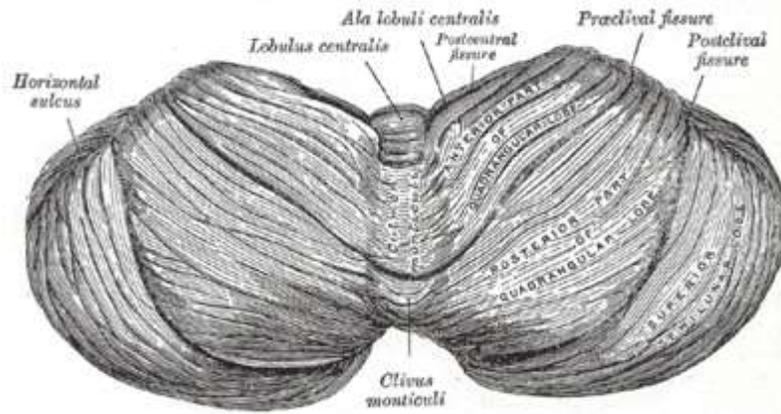


Figura 2: Cara superior del cerebelo

1.3.5 Cara inferior

La cara inferior está directamente apoyada sobre la duramadre que recubre las fosas cerebelosas. Muestra un amplio surco en la línea media denominado vallécula o cisura media que alberga la hoz del cerebelo y en cuyo fondo se encuentra el vermis inferior que es la continuación del superior (ver Figura 3).

Lateralmente a la cisura media se localizan las caras inferiores de las hemisferios cerebelosos, que son convexas hacia abajo. En la parte más anterior y a ambos lados del vermis inferior, los hemisferios cerebelosos presentan una prominencia ovoidea denominada amígdala cerebelosa. Estas amígdalas guardan una estrecha relación con el bulbo raquídeo.

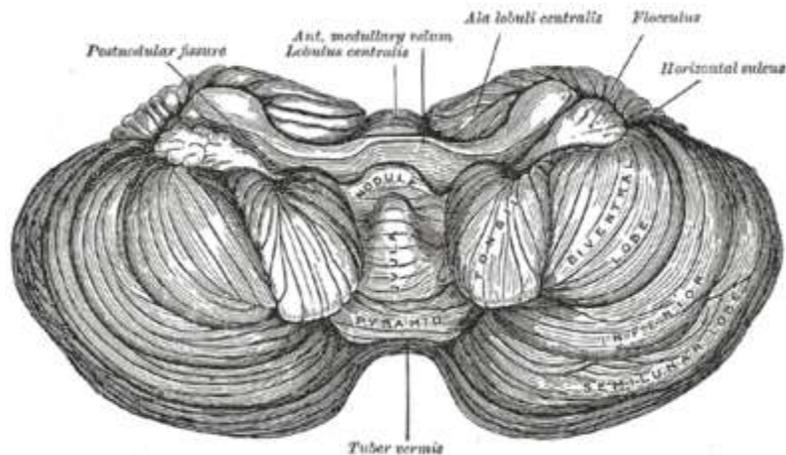


Figura 3. Visión inferior del cerebelo humano. Donde se ven la cara inferior y la cara anterior del cerebelo.

1.3.6 Cara anterior

La cara anterior del cerebelo está íntimamente relacionada con la cara posterior del tronco del encéfalo. Presenta una depresión central que se corresponde con el techo del (IV ventrículo) y está delimitada por los pedúnculos de ambos lados y por los velos medulares superior e inferior. Por encima de esta depresión asoma el extremo anterior del vermis superior o lín-gula, y por debajo se observa el extremo anterior del vermis inferior o nódulo. A ambos lados del nódulo, y por debajo de los pedúnculos cerebelosos inferiores, hay unas prominencias denominadas flóculos. El nódulo y los folículos están unidos entre sí por el pedúnculo del floculo que, en parte, corre sobre el velo medular inferior.

1.3.7 Divisiones

Hay tres maneras diferentes de dividir el cerebelo: morfológicamente, filogenéticamente y funcionalmente.

1.3.8 División Morfológica

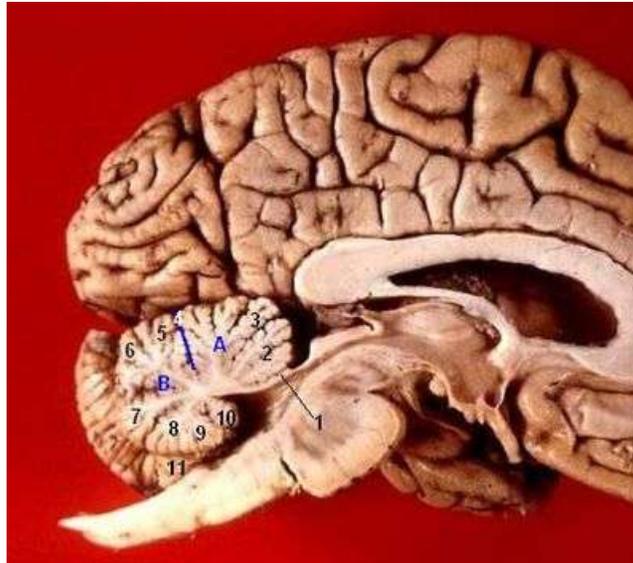


Figura 4. Sección sagital de encéfalo humano. 1:Língula; 2:Lobulillo central; 3:Culmen; 4:Fisura prima; 5:Declive; 6:Folium; 7:Túber; 8:Pirámide; 9:Úvula; 10:Nódulo (lóbulo floculonodular); 11:Amígdala cerebelosa; A:Lóbulo anterior; B:Lóbulo posterior.

Clásicamente se realiza una división morfológica que es meramente descriptiva de la superficie del cerebelo, y no tiene base funcional ni ontogénica ni ninguna aplicación en la práctica clínica. La división morfológica del cerebelo puede resumirse en la Figura 4

1.3.9 Filogenética

Desde el punto de vista filogenético, el cerebelo puede dividirse en tres porciones: arqueocerebelo, paleocerebelo y neocerebelo. Esta división es de gran interés porque cada una de las porciones posee cierta identidad funcional y clínica. El arquicerebelo es la porción filogenéticamente más antigua y se corresponde con el lóbulo floculonodular. La mayoría de aferencias que recibe provienen de los núcleos vestibulares y se corresponde en gran medida con el vestibulocerebelo. Tiene una función en el equilibrio.

El paleocerebelo es más moderno que el arqueocerebelo y está integrado por la pirámide, la úvula, el lobulillo central con las alas, el culmen y el lobulillo cuadrangular. La mayoría de las aferencias que recibe provienen de la médula espinal y tiene cierta correspondencia con el espinocerebelo. Tiene una función de control postural.

El neocerebelo es la parte más moderna y está formado por la totalidad del lóbulo posterior a excepción de la pirámide y la úvula. La mayoría de las aferencias que recibe provienen de la corteza cerebral a través de los núcleos del puente y se identifica con el cerebrocerebelo. Tiene función de coordinación motora (movimientos voluntarios).

1.3.10 Representación topográfica del cuerpo

La corteza cerebelosa posee una representación topográfica de las diferentes partes del cuerpo, del mismo modo que la corteza somatosensitiva, la corteza motora, los ganglios basales, los núcleos rojos y la formación reticular. En el cerebelo, el tronco y el cuello así como las porciones proximales de las extremidades quedan situados en la región perteneciente al vermis. En cambio, las regiones faciales y las porciones distales de las extremidades se localizan en las bandas paravermianas. Las porciones laterales de los hemisferios cerebelosos (cerebrocerebelo) al igual que el lóbulo floculonodular (vestibulocerebelo), no poseen una representación topográfica del cuerpo.

Estas representaciones topográficas reciben aferencias desde todas las porciones respectivas del cuerpo y también desde las áreas motoras correspondientes en la corteza cerebral y en el tronco del encéfalo. A su vez, devuelven señales motoras a las misma áreas respectivas de la corteza motora y también a las regiones topográficas oportunas del núcleo rojo y de la formación reticular en el tronco del encéfalo (Fine E J y col.,2002).

1.3.11 Corteza Cerebelosa. Organización celular específica

Histológicamente el cerebelo esta formado por una capa externa de materia gris denominada corteza cerebelosa, una zona mas interna de materia blanca y tres partes de núcleos profundos llamados núcleo dentado, fastigial e interpuesto.

La estratificación histológica de la corteza cerebelosa es similar en roedores y primates y tiene una organización celular muy uniforme, con las neuronas dispuestas en tres capas o estratos bien definidos: la capa de células granulares internas, la capa de células de Purkinje (PCs), y la capa molecular superficial. (Ver en Figura 5 esquema simplificado de las capas cerebelosas en los planos coronal y sagital).

En el exterior se sitúa la capa molecular. En esta capa se encuentra el árbol dendrítico de las *PCs* y los axones de las neuronas granulares, formando las fibras paralelas que hacen sinapsis a su paso con las *PCs* que encuentran en el trayecto. También podemos hallar en esta capa numerosas interneuronas inhibitoras: las *células estrelladas* y las *células en cesta*, que extienden sus axones hacia capas más internas. Las células estrelladas establecen sinapsis con las dendritas distales de las *PCs* mientras que las células en cesta “envuelven” los cuerpos de éstas.

Por debajo de esta capa más externa se sitúa la capa de *PCs* o capa intermedia, que alberga, principalmente los cuerpos de estas neuronas, que se disponen de forma ordenada y cuyos axones descienden hacia la materia blanca y núcleos profundos constituyendo la única vía eferente del cerebelo.

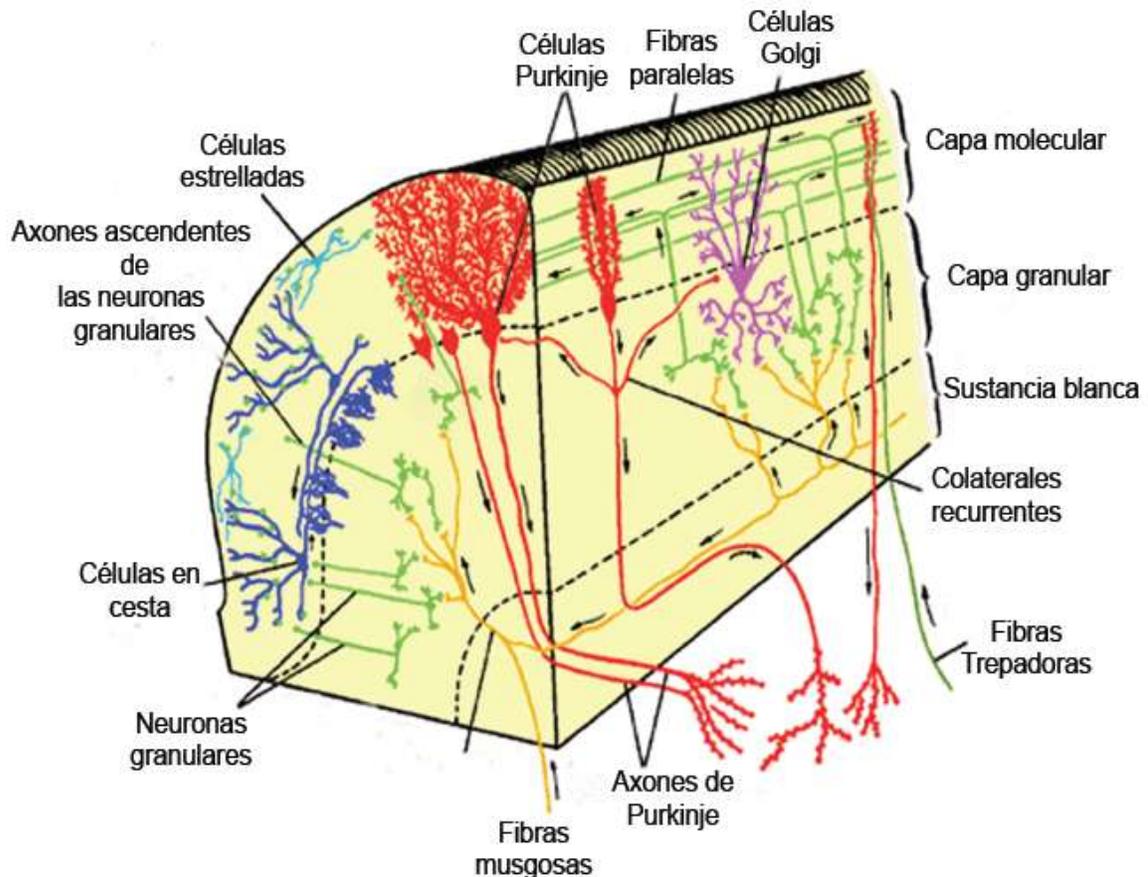


Figura 5. Organización de la corteza cerebelosa en los mamíferos en los planos sagital y transversal. Adaptado de Brain Res 1981. J. A. Schulman and F. E.

Por último y en la zona más interna del cerebelo se encuentra la capa granular, formada principalmente por las pequeñas y numerosísimas *células granulares*. Los axones de estas neuronas ascienden y se bifurcan para formar las fibras paralelas de la capa molecular. Sus dendritas, 4-5 por célula, hacen sinapsis en las terminaciones engrosadas o rosetas de las fibras musgosas donde, además, confluyen los axones de las *células de Golgi*, conformando los llamados glomérulos cerebelosos. En la capa granular existen, además, dos tipos neuronales poco conocidos en sus aspectos electrofisiológicos, las *células de Lugaro*, a las que se supone una función similar a las de Golgi, y las *células en*

cepillo, que mediante las fibras musgosas establecerían contactos con las células granulares.

La corteza cerebelosa contiene también numerosas células gliales entre las que destacan las *células epiteliales de Golgi* o *glía de Bergmann*, que envuelve a las PCs y actúa de guía durante la migración de las células granulares. Además, encontramos otros tipos de *células gliales*, *astrocitos* y *oligodendrocitos*, a los que se les ha dado no solo un papel de soporte y mantenimiento del desarrollo de la corteza cerebelosa, sino también, una intervención directa en el circuito neuronal del cerebelo (Ito M , 1984).

De las ocho clases de células que se encuentran en la corteza cerebelosa, sólo los axones de las PCs se proyectan fuera de la corteza dando lugar a la única vía de salida de la corteza cerebelosa (Sotelo C., 2004). Las otras neuronas son neuronas del circuito local: las células granulares y las células unipolares en cepillo son glutamatérgica, mientras que las otras, en particular, las estrelladas, Golgi y las células en cesta, son GABAérgica.

Las dos principales vías aferentes que transmiten información a la corteza cerebelosa son los sistemas de fibras trepadoras y musgosas que dirigen sus impulsos de manera diferente a las PCs. Las fibras trepadoras se originan desde el núcleo olivar inferior y establece contactos sinápticos con las dendritas de las PCs. Las fibras musgosas reciben información de diferentes núcleos de la médula espinal, el tronco cerebral, y hasta los núcleos profundos del cerebelo. Llegan a la PCs indirectamente a través de células granulares a través de su campo axonal, y las fibras paralelas (Sotelo C., 2004). Las PCs son por lo tanto los elementos pivotaes alrededor de la cual todos los circuitos del cerebelo son organizados: recibe información, la procesa y la canaliza hacia las vías eferentes.

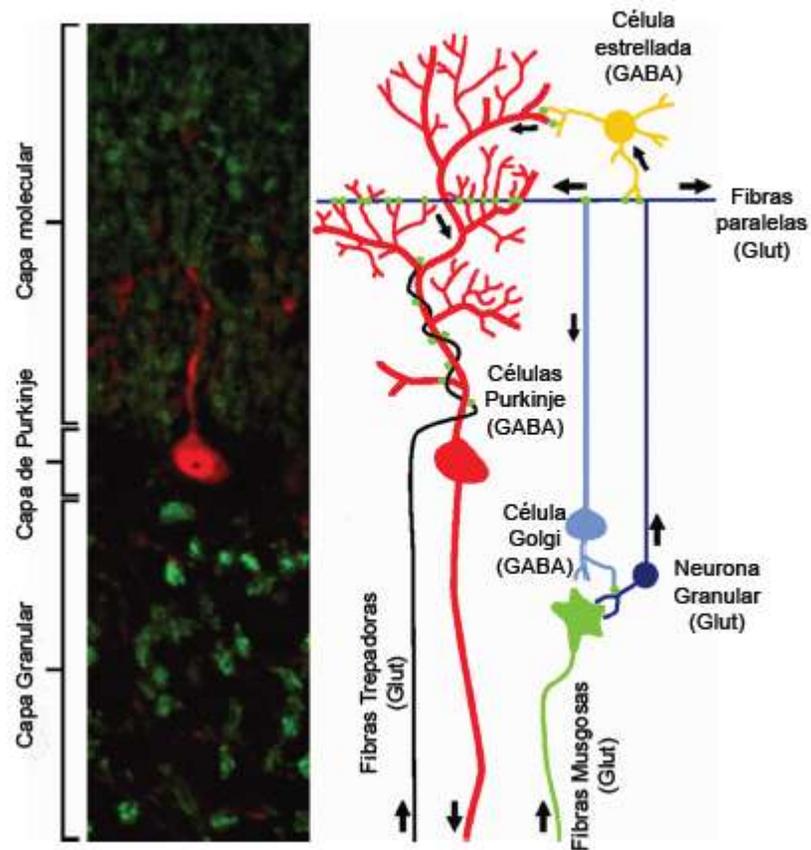


Figura 6. Circuito de neurotransmisión de la corteza cerebelosa. En el esquema se muestran los diferentes neurotransmisores que participan en el circuito cerebeloso.

1.3.12 Conexión del cerebelo

La organización de la conexión del cerebelo es diferente en los primates y los roedores. En mamíferos, las áreas de la corteza cerebral del cerebro anterior hacen conexiones axonales con el cerebelo a través del palidum, el tálamo y la protuberancia; mientras que en los seres humanos las conexiones son unilaterales y cruzadas a través del pedúnculo superior en el cerebelo. Estas proyecciones son corticopontocerebelosas bilaterales en el cerebro de la rata.

1.3. 13 Desarrollo prenatal del Cerebelo

Contrariamente a otras regiones del SNC, las neuronas del cerebelo se generan en dos ondas neuroepiteliales germinativas de los procesos de

proliferación y migración. Este desarrollo ocurre en un orden similar pero a un ritmo diferente en roedores y primates (Figura 7).

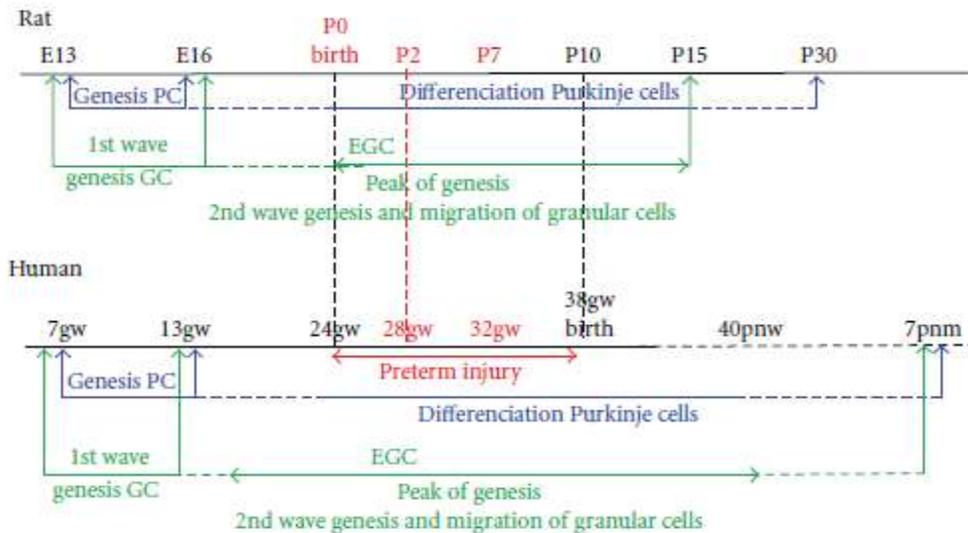


Figura 7. Comparación del tiempo de desarrollo de las PCs y células granulares en la corteza cerebelosa en ratas y humanos. EGL: capa granular externa. Día embrionógico (E), día postnatal 0 (P0), semana gestacional (gw), semana postnatal (pnw), mes postnatal (pnm).

Durante el período embrionario en los mamíferos, la placa del cerebelo surge tanto de las vesículas del mesencéfalo y rombencéfalo (Wingate R J T, 2001).

Las primeras neuronas generadas son las nucleares profundas y todas las PCs. En humanos las PCs son formadas en la zona ventricular entre las 9 y 13 semanas de gestación y migran radialmente hasta su lugar definitivo en la corteza. Ellas maduran mucho después residiendo en la corteza en forma indiferenciada hasta que el desarrollo de la arquitectura cerebral se encuentra avanzado (Friede R L, 1989). El período de 28 semanas de gestación es de crucial importancia para la maduración de las PCs y para el desarrollo de sus asociaciones estructurales y funcionales con las fibras trepadoras (Figura 8).

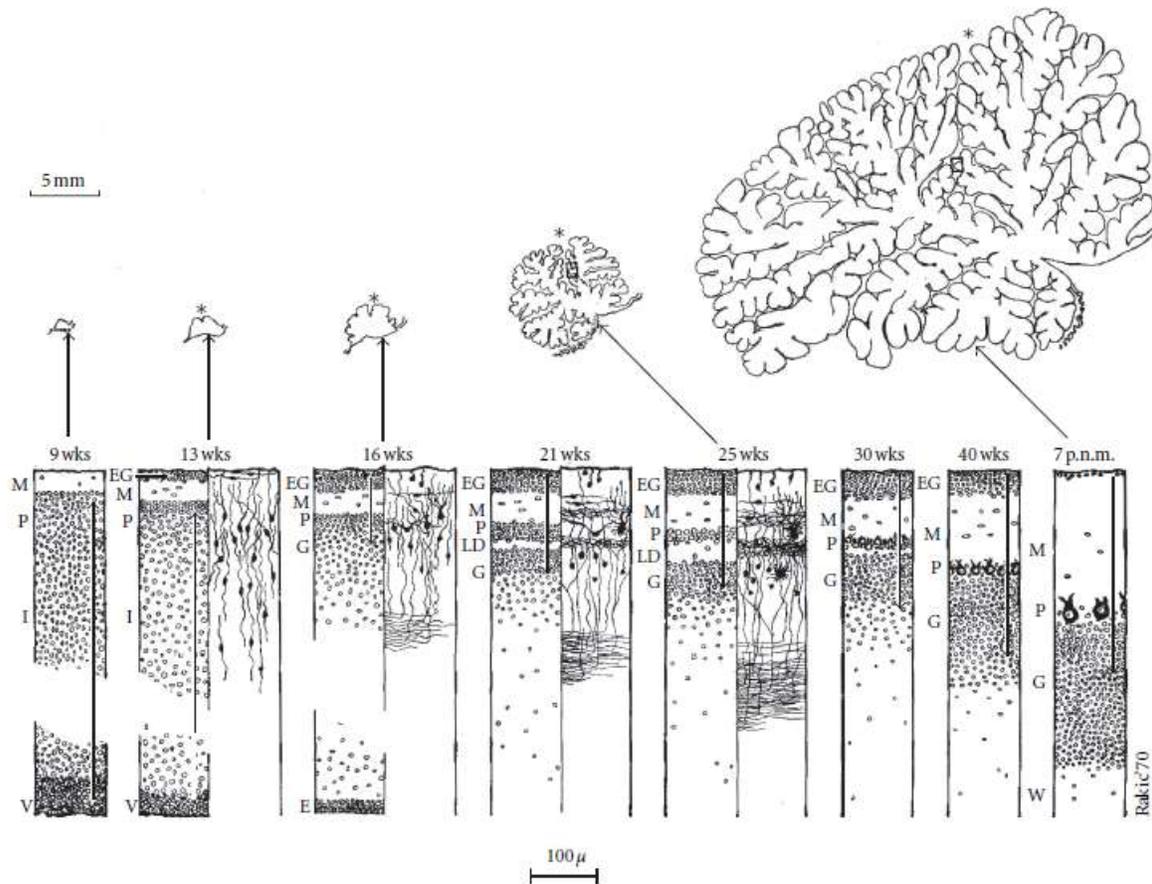


Figura 8: Eventos morfogénéticos e histogénéticos. Síntesis de los principales eventos morfogénéticos e histogénéticos durante el desarrollo del cerebelo humano desde la 9 semana de gestación (wks) hasta el séptimo mes postnatal (pnm) mostrados en el plano sagital a nivel de la cisura primaria. E: epéndimo, EG: capa granular externa, G: capa granular, I: capa intermedia, L: lámina disecante, M: capa molecular, P: capa de células de Purkinje, V: zona ventricular, W: sustancia blanca. Basado en Sidman L. y Rakic P 1973.

En paralelo, los primeros precursores de las células granulares se generan en el labio rómbico rostral (con otras poblaciones de células neuronales), y migran como células granulares precursoras tangencialmente para cubrir la zona superficial de la placa cerebelosa siguiendo una dirección lateromedial y anteroposterior, forman así la capa granular externa (CGE.) (Sotelo C., 2004.).

1.3.14 Desarrollo postnatal

Durante la vida postnatal, la segunda onda de proliferación ocurre en la CGE, las células granulares migran radialmente hacia dentro, hacia su destino final, la capa granular interna (CGI). La proliferación de células granulares es regulada por las PCs que secretan el factor Sonic hedgehog de señalización (Sotelo C., 2004.).

Por otro lado, cabe destacar que si bien las PCs son generadas en un período embrionario temprano la formación de una monocapa celular ocurre en los primeros días post natales (Rakic P y col. , 1970).

En la capa molecular, aparecen entradas sinápticas de los axones de las células granulares (fibras paralelas) concomitante con el inicio de la última dendritogénesis postsináptica de las PCs. La extensión del dominio lateral del árbol dendrítico de la PCs se logra en el día 15 postnatal (P15), su extensión final, es decir, el tamaño adulto, se alcanza a P30. En humanos, el número de folia adulta se consigue unos dos meses después del nacimiento (Loeser J D y col., 1972) y la CGE desaparece alrededor del séptimo mes postnatal (Sidman R L y col., 1973). Hay un aumento en el volumen del cerebelo de aproximadamente 5 veces entre la 24 y 40 semanas de gestación (Chang C H y col., 2000).

Las migraciones gliales y neuronales, así como la dendritogénesis son procesos fundamentales que conducen a microcircuitos funcionales del cerebelo que son eficaces para la plasticidad y el aprendizaje. Curiosamente, la anatomía del cerebelo con un vermis y dos hemisferios situados lateralmente está altamente conservada en los roedores y humanos, lo que sugiere que el análisis de la evolución en los roedores debería proporcionar informaciones directas pertinentes en humanos.

La sobrevivencia y el mantenimiento de las PCs y de las células granulares son dependientes de la proteína salvavidas antiapoptótica, que está altamente expresada en el cerebelo y es fuertemente regulada durante el desarrollo del cerebro postnatal (Hurtado de Mendoza T y col , 2011).

La proteína salvavidas afecta el tamaño del cerebelo, el espesor de la CGI, y el desarrollo de las PCs, lo que sugiere que la proteína salvavidas podría

participar en la patogénesis de diversos trastornos cerebelosos humanos caracterizados por atrofia cerebelosa.

1.4 Función del Cerebelo

Tradicionalmente, se ha considerado al cerebelo como un sistema neuronal que participaba esencialmente en la coordinación y el control motor. Sin embargo, en las últimas décadas ha cobrado fuerza el concepto del cerebelo como un órgano relacionado con procesos cognitivos de alto nivel.

Esta nueva concepción del cerebelo viene apoyada por estudios realizados en animales y humanos con lesiones cerebelosas, así como por la contribución de las modernas técnicas de neuroimagen.

Se sabe que el cerebelo posee una extensa red de conexiones eferentes y aferentes tanto corticales como subcorticales. Filogenéticamente, se cree que el cerebelo inicialmente participaba en actividades relacionadas con la coordinación del movimiento y el tono muscular para conservar el equilibrio, y que, a lo largo de la evolución, ha ido contribuyendo a procesos cognitivos cada vez más complejos: funciones ejecutivas, aprendizaje, memoria procedural y declarativa, procesamiento del lenguaje y en funciones visuoespaciales y afectivas.

1.4.1 Participación del cerebelo en la regulación de las funciones motoras

El cerebelo funciona como un comparador de las diferencias existentes entre las órdenes motoras y sus resultados prácticos, tratando de disminuir los desajustes que se producen durante el movimiento.

El cerebelo recibe información de los planes motores que se elaboran en la corteza cerebral a través de las señales eferentes que llegan por el tracto corticopontocerebeloso y por el haz espinocerebeloso ventral. Además, al cerebelo se le informa del resultado de esos planes motores a través de señales aferentes de propioceptores musculares, receptores articulares y cutáneos, y de los sistemas visual, acústico y vestibular. Mediante la comparación de ambas informaciones, el cerebelo se encarga de corregir la evolución de los actos motores en cada momento determinado del desarrollo de dichos actos y, además,

ayuda mediante el entrenamiento y la repetición a su sincronización y perfeccionamiento. Así, su acción da como resultado un acto motor armónico, suave y continuo, características que pueden perderse tras una lesión cerebelosa.

1.4.2 Cerebelo en el aprendizaje motor y no motor

El cerebelo se ha relacionado tradicionalmente con el aprendizaje de patrones o secuencias motoras, e inicialmente se pensaba que estaba implicado únicamente en la fase inicial del aprendizaje y que su papel iba perdiendo relevancia conforme, a través de la experiencia, se automatizaba la respuesta.

Mediante resonancia magnética funcional (RMf), demostraron que, aunque la activación del cerebelo fuese más intensa en la fase de adquisición del aprendizaje motor y no motor, esta activación sigue presente, aunque con menor intensidad, una vez entrenada la secuencia en la que el cerebelo participaría, creando modelos internos de respuesta para la función cognitiva.

1.4.3 Cerebelo y lenguaje

Distintos estudios evidencian el papel modulador del cerebelo en la función lingüística. Se ha documentado en distintos casos de lesiones cerebelosas la participación del cerebelo en la producción lingüística, y no sólo en la articulación motora del habla (Gillig M P y col 2010).

1.4.4 Cerebelo y habilidades visuoespaciales

La implicancia del cerebelo en el procesamiento de la información visuoespacial se evidencia como el resultado de las lesiones de los circuitos cerebelosos que afectan la habilidad visuoespacial. La capacidad de rotar objetos mentalmente es un posible sustrato funcional de los déficits observados. Comparando el desempeño visuoespacial de sujetos con lesiones focales derechas e izquierdas había diferencias en las características del síndrome. Por lo tanto, la influencia del cerebelo en la cognición espacial parece actuar en múltiples módulos cognitivos (Molinari M. y col., 2004).

1.4.5 Cerebelo, aprendizaje y memoria

Una amplia evidencia científica apunta a que un circuito corticosubcortical que contiene especialmente el estriado, los ganglios basales y el cerebelo es el responsable de la memoria no declarativa, implícita o de procedimientos que, en contraposición a la memoria declarativa o explícita, se encarga de informaciones más subjetivas y del aprendizaje de las habilidades motoras, los hábitos y los comportamientos (Andreasen N C y col, 1995).

El aprendizaje implícito, relacionado con los procesos motores o el aprendizaje verbal, sin ser dependiente de los procesos cognitivos, puede ser no asociativo (habituaación y sensibilización) o asociativo (condicionamiento clásico y condicionamiento operante).

Las lesiones unilaterales del cerebelo alteran el aprendizaje de una tarea visuomotora. Se ha observado que afectan claramente la capacidad de detección de una secuencia y la adquisición del conocimiento declarativo de la tarea. Estas alteraciones se presentan independientemente del hemisferio afectado. En estudios con tomografía por emisión de positrones (PET) se observa una activación cerebelosa bilateral, independientemente de la mano usada, en las tareas de aprendizaje motor. La activación izquierda era más evidente cuando se aprendía el procedimiento, y disminuía una vez que se había completado el aprendizaje. Al ejecutar procesos ya adquiridos, se activaba el núcleo dentado derecho. Estos hallazgos sugieren que el cerebelo juega un papel importante en la detección y el reconocimiento de secuencias de eventos, más que en su planeación y ejecución (Pascual-Leone A y col. 1993; Molinari M y col., 1997).

1.4.6 Cerebelo y atención

Un estudio postula que cuando una persona cambia su foco de atención, lo hace con la suficiente anticipación y preparación, suponiendo que la nueva fuente de información pueda ser relevante. Se sometieron personas con y sin lesiones cerebelosas a estímulos auditivos y visuales alternantes después de una orden. Los individuos normales perdían la información presentada en un lapso de milisegundos pero la recuperaban en gran parte, en medio segundo. Las personas

con lesiones cerebelosas se demoraban cinco veces más en fijar la atención después de la orden. Por medio de la RMf se ha observado que las pruebas de atención visual también activan el cerebelo en forma independiente de la planeación y ejecución de una actividad motora (Barinaga M 1996; Allen G y col. 1997).

1.4.7 Funciones ejecutivas y cerebelo

Las funciones ejecutivas abarcan una serie de procesos cognitivos, entre los que se destacan la anticipación, la elección de objetivos, la planificación, la selección de la conducta, la autorregulación, el autocontrol y el uso de retroalimentación (*feedback*). Se ha establecido una estrecha relación entre la corteza prefrontal dorsolateral y las funciones ejecutivas. Hay que distinguir diferentes formas de funcionamiento disejecutivo en el contexto de las múltiples conectividades existentes entre el córtex prefrontal y otras regiones corticales y subcorticales. Algunas de estas interacciones neurales asocian el córtex prefrontal con módulos de procesamiento en el córtex posterior, como los lóbulos temporal y parietal, estructuras límbicas, como la amígdala y el hipocampo, el núcleo estriado, el cerebelo y los sistemas monoaminérgicos y colinérgicos ascendentes (Tirapu-Ustárrroz J y col., 2011).

1.5 Alteraciones en el cerebelo

El cerebelo actúa automáticamente (sin participación de la conciencia) en la coordinación de los movimientos precisos y finos del cuerpo, comparando la actividad de la corteza motora con la información propioceptiva que recibe de músculos tendones y articulaciones. Así puede realizar los ajustes necesarios de la actividad de las motoneuronas inferiores, como por ejemplo el nivel de descarga de ellas. También el cerebelo envía información a la corteza cerebral motora para inhibir la musculatura antagonista y estimular los músculos agonistas, permitiendo hacer más fluidos y precisos los movimientos voluntarios. Otra función en la que participa el cerebelo es el mantenimiento del equilibrio por las conexiones que tiene con el sistema vestibular y por las modificaciones que puede realizar del tono

muscular. Por último, el cerebelo juega un rol importante en el mantenimiento de la postura del cuerpo. Las alteraciones se evidencian bajo la forma de incoordinación motora, hipotonía y alteraciones del equilibrio.

Las alteraciones en el cerebelo también están asociadas a trastornos cognitivos y afectivos (Exner C y col., 2004) debido a la interrupción de los circuitos de comunicación con la corteza cerebral. Por ejemplo, los individuos afectados de autismo presentan un volumen y estructura anormal del cerebelo, lo que puede afectar a la conexión de los circuitos entre el cerebelo y el cerebro, alterando los mecanismos de aprendizaje (Herbert M R C , 2006). Igualmente alteraciones en la estructura del cerebelo pueden estar asociadas al desarrollo de la esquizofrenia. Otras alteraciones, como la ataxia espinoocerebelar están también relacionadas con el cerebelo, debido a la ruptura que se produce entre las conexiones aferentes y eferentes del cortex prefrontal y estructuras subcorticales, entre las que se encuentra el propio cerebelo (Alekseeva N y col., 2005).

1.5.1 Alteraciones en el cerebelo como consecuencia de una AP

Como consecuencia de diferentes causas, entre ellas la HI, la alteración primaria del desarrollo del cerebelo observada con mayor frecuencia, ha consistido en déficits bilaterales, generalmente simétricos, de los volúmenes de los hemisferios cerebelosos (Volpe J J, 2009). Se han reportado alteraciones morfológicas, como trastornos en la proliferación, migración y organización celular y disminución del número de células del cerebelo (Biran V. y col., 2011).

La AP tiene consecuencias del desarrollo neurológico, potencialmente relacionados con una lesión cerebelosa, alteraciones en las funciones motoras con deficiencias tales como hipotonía, incoordinación motora fina, ataxia y secuenciación motora (Goyen T A y col., 1998; Powls A y col, 1995). La lesión cerebelosa también ha sido implicada en disfunciones a nivel cognitivo, social y conductual entre los pacientes de más edad (Berquin P C y col., 1998; Levisohn L y col., 2000) y puede contribuir a trastornos en las funciones cognitivas y del lenguaje y del comportamiento a largo plazo. (Allin M y col., 2001; Limperopoulos C y col., 2007; Messerschmidt A y col., 2008).

1.6 Estrategias Terapéuticas

Se entiende por neuroprotección a la estrategia terapéutica con el objetivo de retardar o detener la progresión de la pérdida neuronal como consecuencia de la evolución de procesos patogénicos y de diferentes tipos de injurias en el sistema nervioso (Shoulson I, 1992). Una terapia neuroprotectora parcial retrasa la enfermedad, mientras que un tratamiento completamente neuroprotector detiene la progresión de la misma. Hasta la fecha, no hay ninguna terapia que pueda contrarrestar las alteraciones provocadas por la AP. Con el uso de la hipotermia como tratamiento neuroprotector se han observado mejoras en diferentes ensayos clínicos (Thomas N y col., 2011), aunque no ha sido extensamente efectiva en neonatos humanos (González F. y col., 2008). La hipotermia ha demostrado algunos beneficios en casos específicos, produciendo disminución de la muerte de neuronas GABA-érgicas a los 6 meses post AP (Capani F y col., 2009). También se ha demostrado la capacidad neuroprotectora de la hormona esteroidea estradiol (E2), también llamada 17β -estradiol, en diversos modelos de neurodegeneración tanto *in vivo* como *in vitro* (Cardona-Gómez G P y col., 2000; 2002a, 2002b; García-Estrada J y col.1993), observándose que esta acción neuroprotectora del E2 es aplicable al humano.

1.6.1 El E2 como herramienta neuroprotectora

Algunos estudios epidemiológicos mostraron que las mujeres premenopáusicas tienen una menor incidencia de enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia o del infarto cerebral respecto a hombres de la misma edad (Turgeon J L y col., 2004). Estos efectos benéficos fueron otorgados a la presencia de E2, en las mujeres premenopáusicas. El E2 regula en el cerebro varios procesos como la supervivencia celular y la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control de la transmisión sináptica o la regeneración axonal (Maggi A y col., 2004), afectando a los principales componentes del cerebro: las neuronas, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células microgliales (Bruce-Keller A J y col., 2000; Tripanichkul W y col., 2007; Dhandapani K M Y col., 2007;

Zhu T S y col., 2008). La acción neuroprotectora del E2 puede deberse a las propiedades antioxidantes de su estructura química (Behl C. y col., 1997), pero, dicha acción se manifiesta en estudios *in vivo* sólo en presencia de concentraciones suprafisiológicas de la hormona (Moosmann B. y col., 1999).

Cabe destacar que la molécula de E2, tiene efecto neuroprotector actuando a través de sus receptores específicos. La inhibición de los receptores de estrógenos (ERs, Estrogen receptors) mediante su antagonista, el ICI182780, exacerba la lesión isquémica en el estriado de ratones hembra no ovariectomizados (Sawada M. y col., 2000), y bloquea la neuroprotección de los estrógenos en cultivos de neuronas corticales tratadas con dosis excitotóxicas de glutamato (Singer C.A. y col., 1999).

Esta capacidad neuroprotectora del E2 se debe, en parte, a la modulación de la expresión de moléculas implicadas en el control de la muerte celular, promoviendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y reduciendo la expresión de la proteína proapoptótica Bax en la isquemia cerebral (Dubal D.B. y col., 1999). También, los estrógenos tienen la capacidad de bloquear la inducción de la actividad de algunos miembros de la familia de las caspasas, implicados en la iniciación y el desarrollo de la apoptosis en la célula (Pike C J, 1999; Rau S W y col., 2003). La acción beneficiosa de la hormona sobre las neuronas involucraría además su actividad pro-sinaptogénica durante el desarrollo, la regulación de la proteína sinaptofisina implicada en la plasticidad sináptica en el cerebro adulto y el aumento de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo (Gould E. y col., 1990).

1.6.2 Receptores de estrógeno

Para ejercer la mayoría de sus acciones, el E2 necesita interactuar con los receptores de estrógenos (ERs) y activarlos (ver Figura 9). En mamíferos los ER mejor caracterizados son: una forma transmembrana del receptor (GPCR) y dos isoformas intracelulares, el ER α y el ER β . Mientras que el ER α se conoce desde 1985 (Walter P. y col., 1985), no se conoció la existencia del ER β hasta el 1996 (Kuiper G G y col., 1996). Ambos receptores, aunque están codificados por

diferentes genes, presentan una estructura proteica similar. En ausencia de ligando, los ERs se encuentran en el citoplasma unidos a las proteínas de shock o estrés térmico 90 y 70 (Hsp90 y Hsp70, del inglés heat shock protein) en un complejo multiproteico de chaperonas.

A partir del descubrimiento de las distintas isoformas se comenzaron a estudiar los posibles roles de estos receptores en el cerebro. En enfermedades neurodegenerativas se ha observado una expresión diferencial de los ERs. Después de una injuria, aumenta la expresión del ARNm del ER α en presencia o ausencia de la hormona, y disminuye la del ER β , siendo el estradiol el que revierte su baja expresión (Dubal D B y col., 1999). Se sabe que el 17 β -estradiol controla muchos de los aspectos de la fisiología humana, incluyendo el desarrollo, la reproducción y la homeostasis a través de la regulación de la actividad transcripcional de sus receptores. Los ERs son proteínas con mucho movimiento que se trasladan continuamente entre proteínas diana localizadas en diversos compartimentos celulares. Esto permite generar señales de transducción sinérgicas y variadas que aportan versatilidad a la respuesta que induce el E2 en la célula.

1.6.3 Mecanismos de acción del E2.

Al interactuar con los ERs, el E2 desencadena dos posibles mecanismos de acción. Los mecanismos iniciados en el núcleo, conocidos tradicionalmente como mecanismos genómicos o mecanismo clásico, donde el E2 unido a los receptores promueve su translocación al núcleo, activando la transcripción génica. Y los mecanismos iniciados en la membrana., también llamados mecanismos no genómicos, a partir de la interacción de la hormona con ERs en la membrana o citoplasma, activando vías de señalización intracelular.

Cabe destacar que estudios recientes demuestran que los mecanismos iniciados en la membrana también terminan produciendo una regulación transcripcional.

1.6.4 Mecanismos de acción del E2 iniciados en el núcleo.

Los ERs son factores de transcripción que desarrollan sus capacidades transcripcionales al ser reclutados a la región promotora del gen diana, iniciando su actividad de transactivación mediante la interacción con la secuencia consenso en el ADN conocida como elemento de respuesta a estrógenos (ERE), que actúa como potenciador de las regiones reguladoras localizadas en los promotores de los genes diana (Beato M, 1989; 1996.). La secuencia de los ERE afecta la afinidad con la que el receptor se une al ADN, determinando, al menos en parte, cuál de los ERs puede activar la expresión génica (Loven M A y col., 2001a; Loven M A y col., 2001b). Además, los estrógenos interaccionan con proteínas correguladoras para unirse al ADN, conformando el complejo que constituye la plataforma sobre la que se ensamblarán las proteínas de la maquinaria transcripcional. En la expresión génica dependiente de los ERs intervienen varias vías de señalización celular. La unión del estrógeno a su receptor induce cambios conformacionales en los mismos y recluta proteínas correguladoras (Smith C L y col., 2004). Se asume que sólo la forma dimérica del receptor manifiesta la capacidad de regular la transcripción génica. Por lo tanto, puede actuar en los tres estados diméricos ($ER\alpha$ - $ER\alpha$, $ER\alpha$ - $ER\beta$ o $ER\beta$ - $ER\beta$), regulando cada uno de éstos la expresión de diferentes genes diana (Hall A C y col., 2000). Por acción de los estrógenos también se puede activar la transcripción de genes que carecen de una secuencia ERE en su promotor. La activación de dichos genes requiere la presencia de factores de transcripción que medien la asociación de los receptores con el ADN (O`Lone R y col., 2004).

1.6.5 Mecanismos de acción del E2 iniciados en la membrana.

El E2 puede interaccionar con los ERs en la membrana plasmática, el citoplasma y las mitocondrias tanto en neuronas como en células gliales activando diferentes vías de transducción de señales: la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, Phosphoinositide 3-kinase) (Cardona-Gómez G P y col., 2002a; McEwen B., 2002), la vía de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Mitogen-activated

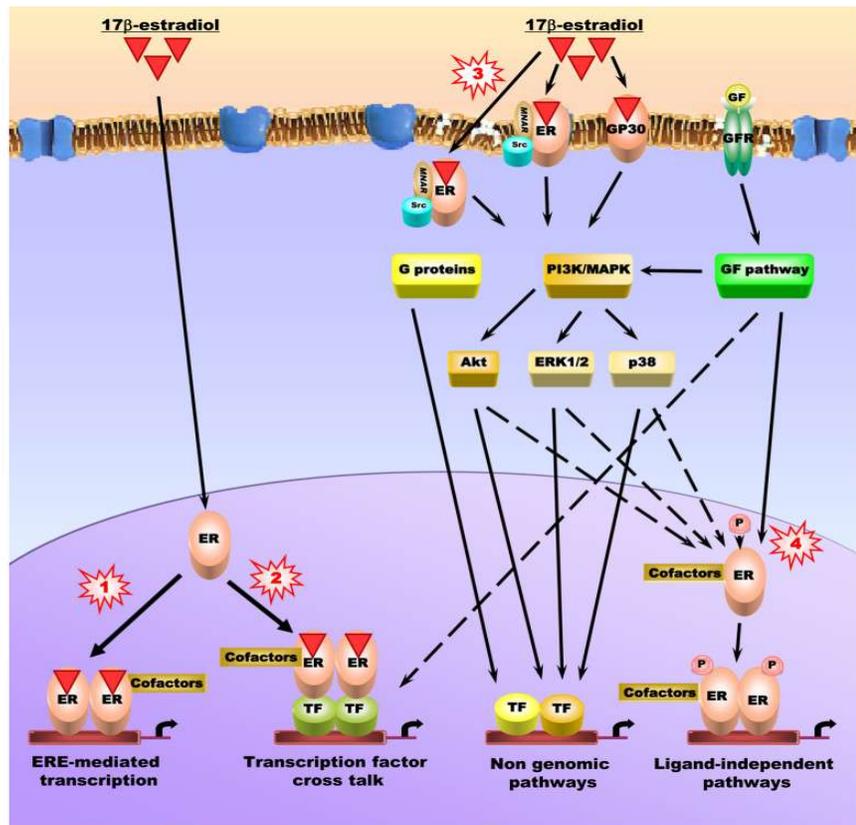
protein kinase) (Benito M. y col., 1996; Toran-Allerand C D y col., 1999) o la de las proteínas G (Moss R L y col., 1999; Raap D K y col., 2000). Estos efectos se caracterizan por ocurrir rápidamente, en segundos o minutos. La principal vía de las MAPKs mediada por los ERs involucra a la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, Extracellular signal-regulated kinases). A pesar de que en múltiples modelos se ha comprobado que el E2 activa la vía MAPK/ERK (Keshamouni V G y col., 2002; Song R X y col., 2002), se desconoce el mecanismo concreto por el que ejerce dicha regulación. Una vez activada, ERK puede translocarse al núcleo e interaccionar, directa o indirectamente, con factores nucleares de transcripción. De esta manera, señales que se originan en membrana regulan la transcripción génica, pudiendo ser un mecanismo adicional mediante el cual el E2 regula la expresión de genes que no contienen secuencias consenso ERE como el de la β -tubulina y MAP-2 (Lorenzo A y col., 1992).

Los estrógenos promueven la activación de PI3K mediante la asociación directa del ER α con esta enzima (Castoria G. y col., 2001; Méndez P. y col., 2003), regulando la producción del mediador de la supervivencia conocido como proteína serina/treonina quinasa (AKT, Serin/threonine protein kinase). A su vez, AKT puede inhibir la apoptosis inducida por diferentes estímulos, actuando sobre varios factores implicados en la muerte celular como son los miembros de la familia de Bcl-2 o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3, Glycogen synthase kinase 3). AKT incrementa la cantidad de Bcl-2 presente en la célula (Yune T.Y. y col., 2008) e inhibe la actividad de GSK3 mediante fosforilación inhibitoria (Cohen P. y col., 2001). El mecanismo mediante el cual el E2 regula la actividad de la vía de señalización de la PI3K parecería involucrar al ER α , pero no así al ER β (Simoncini T. y col., 2000).

1.6.6 Interacción con factores tróficos.

Los factores neurotróficos son proteínas de secreción que pertenecen a una clase de factores de crecimiento involucrados en la supervivencia, diferenciación y crecimiento celular (Hempstead B.L., 2006; Reichardt L F., 2006; Allen S J. y col., 2006). Dentro de determinadas áreas del SNC, algunas neurotrofinas como el

factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro



(BDNF) y la neurotrofina 3 (NT-3), interaccionan con la señalización desencadenada por el E2 (Toran-Allerand C D., 1996).

Figura 9. Esquema de las vías de señalización intracelulares del E2. Se observan las vías activadas por los estrógenos descritas anteriormente dentro de las cuales se destacan la vía de las MAPKs, la vía de PI3K y la vía acoplada a proteínas G. Modificado de Quiagen website, 2011.

En un modelo de AP para estudiar neuronas y astrocitos del hipocampo y del núcleo estriado dorsal a los 30 días (contactos sinápticos maduros) y a los 120 días (adultez) de inducida la injuria se estudió el efecto neuroprotector de un tratamiento tardío con E2 (dosis diaria de 250 µg/kg durante 3 días) el cual revirtió las alteraciones observadas a largo plazo, asociadas a un aumento en la colocalización del ERα con astrocitos GFAP+. El mecanismo postulado fue mediante la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/GSK3, afectando la morfología y la plasticidad de los procesos neuronales y contactos sinápticos

mediante la regulación de la fosforilación de GSK3 y las proteínas del citoesqueleto (Saraceno G E., 2012).

1.6.7 Papel neuroprotector del E2 en el tratamiento de la AP

El uso de E2 como neuroprotector para tratar las alteraciones producidas por la AP ha sido recientemente evaluado en nuestro laboratorio. (Saraceno G E 2010). En ese estudio se focalizó en el efecto sobre las alteraciones producidas por la AP en el hipocampo. Para ello se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 4 meses de edad, de sexo masculino, sometidas a AP e inyectadas durante 3 días consecutivos con E2 o vehículo.

Como se ha descrito antes, se observó, en el hipocampo de los animales que sufrieron AP y que fueron tratados con vehículo: astrogliosis clásica, inflamación focal y apariencia fragmentada de las dendritas inmunoreactivas en MAP-2, disminución en la inmunorreactividad de MAP-2 y de la fosforilación de neurofilamentos de alto y medio de peso molecular, comparado con animales controles. Estas alteraciones son marcadores conocidos de daños neurodegenerativos. El tratamiento tardío con E2 revirtió estas alteraciones (Saraceno G E , 2010).

Las propiedades neuroprotectoras del E2 habían sido descritas anteriormente en tratamientos donde la hormona ha sido administrada antes o poco después de la inducción del daño cerebral. En el trabajo de Saraceno y col se demostró que la administración tardía del E2 puede reducir, en animales adultos, las alteraciones neurodegenerativas crónicas inducidas por PA en las primeras etapas de desarrollo.

Los mecanismos involucrados en las propiedades neuroprotectoras del E2 aún no se fueron completamente dilucidados. Dado que las proteínas de los NF son objetivos preferentes para el estrés oxidativo, se postuló que los estrógenos pueden inducir su función neuroprotectora modulando la producción de radicales libres. Además, muchas evidencias sugieren que los estrógenos están relacionados con la facilitación y la preservación de crecimiento de neuritas durante el desarrollo del SNC. Por último, los efectos del E2 pueden ser mediados por la activación de ERK, que está implicado en el mantenimiento de la

organización árbol dendrítico y la morfología neuronal en condiciones pro-apoptóticas (Barreto G. y col., 2015).

Dado los resultados promisorios encontrados en el tratamiento con E2 sobre las alteraciones hipocampales producidas por la AP, en esta tesis estudiaremos si esta hormona también puede revertir las alteraciones cerebelares.

1.6.8 Campo de aplicación de los resultados.

La HI cerebral, tanto durante el momento del nacimiento como la desencadenada durante un proceso de accidente cerebro vascular en el adulto, es un importante problema de salud a nivel mundial, no sólo por ser una relevante causa de muerte sino por las secuelas que deja a largo plazo. En la actualidad, es el factor principal que produce alteraciones neurológicas y la tercera causa de muerte en los países desarrollados (Miller S P y col., 2009).

El conocimiento de las alteraciones causadas por la AP ya sea a corto como a largo plazo en las distintas áreas cerebrales permitirá poder diseñar terapias específicas que contrarresten los daños producidos. Si bien áreas del SNC como corteza e hipocampo han sido ampliamente estudiadas, las modificaciones crónicas cerebelares inducidas por una AP aún no han sido evaluadas. Es por esta razón que el estudio de las modificaciones a largo tiempo del cerebelo ayudará a entender mejor la fisiopatología desencadenada por esta injuria.

Por otro lado, no existe hasta el momento una terapia específica que pueda contrarrestar las alteraciones provocadas por la AP. En un intento por encontrar una terapia adecuada, se utilizó E2 como neuroprotector y se observaron resultados promisorios cuando se analizaron las alteraciones en el hipocampo. En este trabajo estudiaremos el efecto de este tratamiento sobre las alteraciones causadas en el cerebelo, por lo cual se espera que los resultados obtenidos por la implementación del tratamiento tardío con estradiol puedan sentar las bases para el desarrollo de una posible terapia.

HIPÓTESIS

1.7 Hipótesis

1- Los eventos inducidos por la asfixia perinatal (AP) en el SNC desencadenan alteraciones crónicas neuronales y gliales en la corteza del cerebelo, asociados a marcadores de neurodegeneración y muerte celular.

2- El tratamiento con E2 puede revertir los cambios producidos por la AP.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

- **Estudiar las consecuencias crónicas de la AP sobre el cerebelo.**
- **Determinar si el E2 es una herramienta terapéutica válida para contrarrestar las alteraciones cerebelares causadas por la AP.**

2.2 Objetivos Específicos.

1-Evaluar la extensión de la injuria en cerebelo producida a los 120 días post AP. Se utilizará para ello la tinción con azul de toluidina.

2-Determinar la presencia de gliosis reactiva como indicador de injuria cerebral en animales a los 120 días post AP. Se utilizará la técnica de Inmunohistoquímica y Western blot para detectar la proteína GFAP que se expresa exclusivamente en astrocitos en el SNC.

3-Determinar si la AP produce a largo plazo alteraciones celulares y subcelulares en el citoesqueleto de las neuronas. Se utilizarán las técnicas de Inmunohistoquímica para detectar las proteínas MAP2 que es una familia de proteínas específica del citoesqueleto neuronal.

4-Observar la morfología de los núcleos neuronales a los 120 días post AP. Para ello se teñirá la proteína NeuN, específica de núcleo neuronal por Inmunohistoquímica.

5-Determinar la relación Bcl-2/Bax como índice de la susceptibilidad celular a la muerte por apoptosis. Se utilizarán las técnicas de Western-blot para evaluar Bcl-2 (molécula con propiedades antiapoptóticas), así como la expresión de Bax (moléculas marcadoras de apoptosis).

6-Estudiar el efecto del tratamiento tardío con E2 sobre las alteraciones producidas en el cerebelo por una AP. Para ello se realizarán sobre cerebelos de ratas que sufrieron AP y fueron tratadas tardíamente con E2, los estudios morfológicos y bioquímicos indicados en los ítems anteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Todos los procedimientos que involucraron animales fueron aprobados por el Comité Institucional de cuidado y uso animal de la Universidad de Buenos Aires (Facultad de Medicina) (CICUAL#4091/04). Además, dichos procedimientos fueron llevados a cabo según los principios que figuran en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publications No. 80-23, revisión 1996).

Ratas de la cepa Sprague Dawley en el día 15 de preñez fueron colocadas en jaulas individuales y mantenidas con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h, a temperatura y humedad ambiental controladas. Los animales tuvieron acceso a comida (Purina chow) y agua corriente *ad libitum*. Las ratas que parieron sus crías normalmente fueron usadas como madres sustitutas mientras que con las otras se llevó a cabo el procedimiento de AP mencionado a continuación.

3.1.1 Inducción a la HI

El protocolo de AP fue llevado a cabo utilizando un modelo experimental en el que se provoca una asfixia controlada desarrollado por Bjelke (Bjelke, B. y col., 1991) y aplicado y modificado por Capani (Capani, F. y col, 1997; Capani F. y col., 2001).

Brevemente se procedió como se indica a continuación: se realizó una histerectomía a ratas preñadas en el día 21 de gestación, seguidamente los cuernos uterinos conteniendo los fetos fueron colocados en un baño de agua termostaticado a 37 °C durante 19 minutos. Concluido el tiempo de asfixia, los fetos fueron extraídos del útero, secados de sus fluidos y estimulados manualmente a respirar, siendo un signo importante de su recuperación el boqueo o *gasping*. Posteriormente se ligó el cordón umbilical y se colocó a los animales en cámaras de recuperación a temperatura apropiada. Una vez que recuperaron sus condiciones fisiológicas fueron correspondientemente marcadas y mezcladas con los animales control (de nacimiento normal) para colocarlos con una madre sustituta cuyo parto se produjo dentro de las 24 horas de realizado el experimento,

reemplazando parte de su camada por animales experimentales hipóxicos previamente identificados (Figura 10).

En trabajos previos se ha demostrado que no se observan diferencias entre los animales controles y los nacidos por cesárea razón por la cual nosotros utilizamos como animales del grupo control a aquellos que nacieron por parto natural.

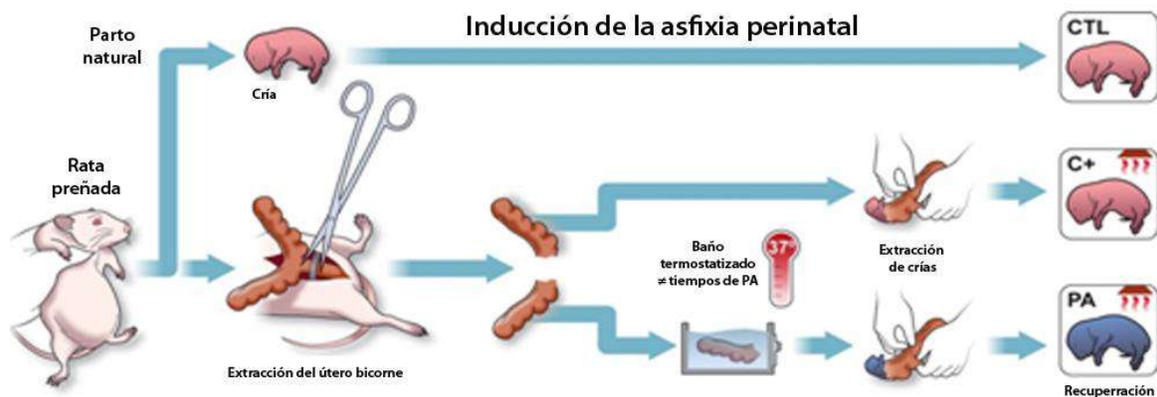


Figura 10. Modelo murino de AP. El esquema representa la forma en que se realiza el modelo experimental utilizado en el presente trabajo. Además, se muestran los grupos experimentales obtenidos: CTL, corresponde a ratas obtenidas por parto normal; C+, representado por ratas obtenidas por cesárea sin exposición a la injuria; PA, grupo conformado por ratas sometidas al modelo de PA. Tomado de Galeano y col., 2011.

3.1.2 Protocolo de neuroprotección

Diseño experimental: el diseño experimental combina la realización del modelo de PA, sometiendo las crías durante 19 minutos de injuria, con la administración intraperitoneal de un tratamiento tardío de E2 de 3 días de duración (dosis diaria de 250 µg/Kg) o de su diluyente (solución fisiológica) antes del sacrificio. Todos los grupos experimentales se sacrificaron a los 120 días post PA (Ver Figura 11).

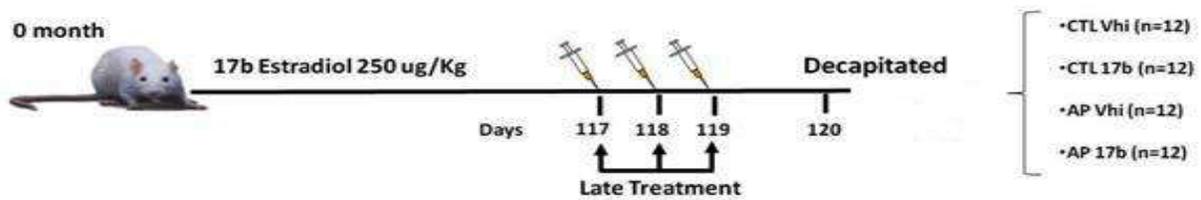


Figura 11 Protocolo de neuroprotección

Se generaron los siguientes grupos experimentales, a saber:

- Controles (CTL) nacidos de manera natural inyectados con Vhi.
- Hipóxicos (AP), animales sometidos a AP inyectados con Vhi.
- Controles tratados con E2 (CTL-E2) nacidos de manera natural inyectados con E2.
- Hipóxicos tratados con E2 (AP-E2), animales sometidos a AP inyectados con E2.

3.2 Análisis celular y subcelular

3.2.1 Exámenes histológicos

Preparación de los tejidos para microscopia óptica.

Las ratas de tres meses de edad fueron anestesiadas (Mebutal 50 mg/kg de peso corporal, ip) y perfundidos transcardiamente con 30-50 ml con 4% de paraformaldehído en 0,1 M buffer fosfato salino (pH 7,4) (PBS). Se retiraron los cerebelos, se fijaron en la misma solución durante 2 h a temperatura ambiente, y luego se sumergieron en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) conteniendo 20% de sacarosa a 4 °C durante la noche. Luego los cerebelos fueron incluidos en parafina, se cortaron con la ayuda de un micrótopo en secciones sagitales de 4 µm de espesor. Los cortes fueron desparafinados por inmersión en xileno (dos cambios de 5 min. cada uno) e hidratados por inmersión sucesiva en etanol al 100%, 96%, 70% y agua realizándose dos cambios de 5 min. en cada solución.

3.2.2 Inmunohistoquímica

Los cortes hidratados fueron sometidos a:

- Recuperación antigénica. para ello se colocaron en una solución de buffer citato 0,01M, pH 6 a 95 °C y posteriormente fueron calentados durante 5 min en microondas en baño de agua. Este último procedimiento se repitió dos veces rectificando el agua evaporada entre cada vez, dejándose enfriar hasta temperatura ambiente.
Posteriormente los cortes fueron lavados cuatro veces con H₂O destilada.
- Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena: los cortes se sumergieron en una solución de H₂O₂ 0,3% preparada en metanol 60% durante 20 min. con agitación.
- Lavado y permeabilización: posteriormente, los cortes fueron lavados tres veces durante 5 min. cada vez con H₂O destilada con agitación y luego permeabilizados por incubación durante 5 min en Buffer A cuya composición es Tritón X-100 0,3% v/v en PBS.
- Bloqueo: los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos fueron bloqueados por incubación de los cortes con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 5% en buffer A durante una hora a temperatura ambiente.
- Incubación con anticuerpo específico. los cortes se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos específicos diluidos en Buffer A. Los anticuerpos utilizados y la dilución utilizada se indican en la Tabla 1
- Lavado: se lavó el anticuerpo primario con buffer A durante 5 min. Este procedimiento se repitió 5 veces.
- Incubación con anticuerpo secundario: los cortes se incubaron en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios unidos a biotina diluidos en Buffer A. Los anticuerpos utilizados y la dilución utilizada se indican en la Tabla 1.
- Lavado se lavó el anticuerpo secundario con buffer A durante 5 min. Este procedimiento se repitió 5 veces.

Anticuerpo Primario	Dilución	Empresa	Anticuerpo Secundario biotinilado	Dilución	Empresa
Anti-GFAP	1:250	Sigma St. Louis, MO, EE.UU	Anti-IgG de conejo	1:5000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.
Anti-NeuN	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Anti-IgG de Ratón	1:5000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.
Anti-calbindinaD28K	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Anti-IgG de Conejo	1:5000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.
Anti-MAP-2	1:500	Sigma St. Louis, MO, EE.UU	Anti-IgG de ratón	1:5000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.

Tabla 1: Lista de anticuerpos utilizados en la técnica de Inmunohistoquímica.

- Amplificación: para amplificar la señal se incubaron los cortes con el complejo Streptavidina- Peroxidasa de rábano picante (HRPP) (Dako) en una dilución 1:100 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente.

- Lavado: se lavó el excedente de Streptavidina- Peroxidasa con buffer A durante 5 min. Este procedimiento se repitió 4 veces y posteriormente con H₂O destilada tres veces.
- Revelado: para revelar los sitios unión de antígeno/anticuerpo se utilizó el cromógeno 3,3 'diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Deshidratación: las secciones teñidas se deshidrataron al ser sumergidas 5 min. en cada una de las siguientes concentraciones crecientes de etanol: 70%, 96% y 100% y en xileno.
- Montaje: se montaron en bálsamo de Canadá.

Tinciones controles se realizaron incubando con Buffer A en lugar del anticuerpo primario. En ningún caso se detectó inmunorreactividad en estas muestras controles.

3.2.3 Azul de Toluidina:

El colorante se preparó con Azul de Toluidina al 1% en agua destilada. Los cortes se tiñeron durante 5-15 minutos. Se enjuagaron en agua corriente y destilada y se prosiguió con la deshidratación e inclusión.

3.2.4 Fotografía y análisis de imágenes

Las imágenes fueron fotografiadas usando un microscopio Nikon Eclipse 80i y el programa Visiopharm System Integrator.

n todos los casos, el material examinado, las imágenes se procesó en el sametime con las mismas soluciones, para evitar diferencias de tejidos o deformaciones biológicas.

Las secciones sagitales analizadas estuvieron entre 1,13 y 1,40 mm de distancia de la línea media de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson.

Se determinó el número de células por área usando el "contador de células", herramienta plug-in del programa Imagen J (NIH Image 1.6).

Las células de la capa molecular se cuantificaron en micrográficas de ampliación 25 X en una cuadrícula considerando 4 cuadrados de 10.000 μ m² cada uno

(superficie total $40.000 \mu m^2 = 0,04 mm$) en cada imagen de tal manera que toda la zona estuvo representada.

Las células de la capa granular se cuantificaron a partir de $100 \times$ en una cuadrícula considerando 4 cuadrados de $250 \mu m^2$ (superficie total de $2000 \mu m^2 = 0.002 mm$) en cada imagen.

En todos los casos, la posición relativa del recuento de la grilla fue randomizada para proporcionar una muestra no sesgada. Posteriormente, se calculó el número de células por mm^2 .

Para evaluar la densidad lineal de las células de Purkinje, cuantificamos una longitud determinada por medio de la función "Recta" del software Image J.

3.3 Análisis molecular

3.3.1 Procesamiento de las muestras

Los cerebelos provenientes de ratas controles y asfícticas tratadas con solución fisiológica o E2 fueron extraídos y se mantuvieron congelados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento.

Los mismos fueron homogenizados en buffer RIPA (Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM), EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0,1%) conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, aprotinin 5 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin 5 $\mu\text{g/ml}$, de manera de mantener la relación de 200 mg de proteína/ml de buffer.

Los cerebelos fueron sonicados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, tres veces durante 15 segundos cada vez, en buffer RIPA en ausencia de los detergentes, los cuales fueron agregados luego y posteriormente incubados durante 2 min a 4°C . El extracto obtenido fue centrifugado a 12.000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. en una centrifuga Sorvall RMC14. El sobrenadante obtenido fue colectado y utilizado para la medición de proteínas y para el análisis por Western blot como se indica a continuación

3.3.2 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la concentración de proteínas presente en los extractos tisulares se llevó a cabo por el método de (Bradford M., 1976).

Como patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA), construyéndose una curva patrón con los valores de absorbancia a 595 nm de las diferentes diluciones (conteniendo entre 0 y 75 μg) de esta proteína. Para calcular la concentración de las proteínas se ajustaron las mezclas problema a un volumen de 5 μL y se mezclaron con 200 μL del reactivo comercial Bradford de Bio-Rad. Se midió la absorbancia a 595 nm de la mezcla en el espectrofotómetro y los valores de concentración de proteínas se obtuvieron interpolando los resultados en la recta patrón.

Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de las muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma cantidad de proteína (50 μg) en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis.

3.3.3 Western blot

Para la realización del Western blot se procedió a realizar los siguientes pasos

- Preparación de la muestra: se mezclaron tres volúmenes de los extractos de proteínas solubilizadas con un volumen de buffer de carga concentrado 4 veces y cuya composición es la siguiente: 50% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8, 20% (v/v) SDS, 8% (v/v) Azul de Bromofenol 5% (v/v) β -mercaptoenaol. Una vez bien mezcladas, las muestras se calentaron a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 minutos y posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm durante un minuto.
- Siembra de la muestra: Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida de 10% ó 12% (p/v) según fue requerido en cada caso, en presencia de SDS, de diez pocillos, reservándose uno de estos pocillos para cargar la mezcla de patrones coloreados de peso molecular conocido.
- Separación de proteínas: se procedió a la separación de las proteínas en función de su peso molecular por medio de electroforesis desnaturante. Se llevó a cabo utilizando un sistema mini-Protean 3 de Bio-Rad, durante

aproximadamente 120 minutos a un voltaje constante de 120 voltios a temperatura ambiente, empleándose un buffer de electroforesis cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0,1% SDS, a un pH aproximado de 8,6.

- Equilibrio en buffer de los geles: una vez que las proteínas fueron separadas los geles se equilibraron en buffer de transferencia (192 mM glicina, 25mM Tris y 20% (v/v) de metanol, a un pH 8,6) durante 15 min.
- Activación y equilibrio de la membrana de PVDF: para activar las membranas de PDVF (Amersham Bioscience) se introdujeron durante 30 segundos en metanol, seguidos de 5 minutos en agua destilada y posteriormente 30 min en buffer de transferencia de manera de que quede equilibrada en dicho buffer.
- Transferencia: la transferencia de proteínas se llevó a cabo empleando un sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad, a una intensidad de 20 mA durante toda la noche a 4 °C.
- Bloqueo: para bloquear la membrana de manera que no se pegue inespecíficamente el anticuerpo, se utilizó una solución de bloqueo, compuesta por: TBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, a un pH de 7,5) conteniendo 1% (v/v) de Tween-20 y 3% de BSA o 5% de leche descremada, durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital.
- Incubación con anticuerpo específico: una vez concluido el bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en buffer TBS-Tween 20 al 0,1% durante toda la noche a 4 °C. La relación de los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas pueden verse en la tabla 2:

Anticuerpo Primario	Dilución	Empresa	Anticuerpo Secundario unido a peroxidasa	Dilución	Empresa
GFAP	1:4000	Sigma	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad
Actina	1:1000	Sigma	Anti-ratón	1:5000	Bio Rad
GAPDH	1:1000	Sigma	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad
ER α	1:1000	Santa Cruz	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad
ER β	1:1000	Santa Cruz	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad
Bcl-2	1:1000	Cell Signalling	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad
Bax	1:1000	Cell Signalling	Anti-conejo	1:5000	Bio Rad

Tabla 2: Lista de anticuerpos utilizados en la técnica de Western-blot.

- Lavado: el exceso de anticuerpo primario se lavó con buffer TBS-Tween 0,1% durante 10 min., repitiéndose el procedimiento tres veces.

- Incubación con anticuerpo secundario: se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (anti-IgG HRP de ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado. Esta incubación se llevó a cabo en buffer TBS-Tween 20 al 0,1%, a temperatura ambiente en agitador orbital durante una hora.
- Lavado: el exceso de anticuerpo secundario se lavó con buffer TBS-Tween 0,1% durante 10 min., repitiéndose el procedimiento tres veces, posteriormente se realizó un lavado de 10 min con TBS .
- Revelado de la membrana: el revelado se llevo a cabo incubando la membrana durante 5 minutos con las soluciones del kit ECL Western blotting análisis system de Amersham. Este sistema se basa en la oxidación que la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario ejerce sobre el luminol, presente en el kit, generando la emisión de luz que puede ser detectada por las placas radiográficas. En este trabajo se emplearon placas radiograficas (High performance chemiluminiscence) de Amersham, y fueron reveladas manualmente.
- Cuantificación de las bandas obtenidas: las placas obtenidas fueron digitalizadas y la densidad óptica de las bandas proteicas fue determinada utilizando el software NIH Image 1.6.

3.4 Análisis estadístico

Se analizó el material de 12 ratas para cada grupo experimental. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de dos vías de la varianza (ANOVA). Cuando los efectos de interacción fueron significativos, los análisis de los efectos simples fueron llevadas a cabo por las comparaciones post hoc mediante la prueba t. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Diferencias con una probabilidad de 5% o menos se consideraron significativas ($P < 0,05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software PASW Statistics 18 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE.UU.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar los cambios morfológicos y citológicos neuronales y gliales en la corteza cerebelosa, así como el efecto del tratamiento tardío con estradiol sobre las alteraciones producidas en el cerebelo por una AP analizamos el cerebelo de ratas de cuatro meses de edad sometidos a PA. Se evaluaron las diferentes estructuras de la corteza cerebelosa en 12 muestras de cada grupo, control, PA, control tratado con 17β -estradiol y AP tratado con 17β -estradiol.

Se determinó la relación Bcl-2/Bax como índice de la susceptibilidad celular a la muerte por apoptosis a través de Western blot.

4.1 Determinación del grosor de las capas de la corteza cerebelar

4.1.1 Espesor de la capa Molecular

El espesor de la capa molecular se midió en las fotografías de cortes de cerebelo teñidas con azul de toluidina (Fig 12) e inmunoteñidas con anticuerpo anti-NeuN (Fig 13) utilizando el software Image J. Para este fin, al menos 5 mediciones se realizaron en cada fotografía (10 fotografías por cerebelo, ver imágenes representativas en la Figuras 12 y 13). Como se aprecia en los Paneles B de la Figuras 12 y 13, el espesor de la capa molecular es mayor en los animales AP. Cuando se cuantificó el espesor de esta capa a partir de las imágenes de los cortes teñidos con azul de toluidina, se determinó un aumento significativo de aproximadamente 30% en animales AP en comparación con los controles ($P < 0,05$) como se muestra en la Figura 14. Un resultado similar se obtuvo cuando las mediciones se llevaron a cabo a partir de las inmunotinciones de NeuN. Por otro lado, el tratamiento con estradiol no modificó el espesor de la capa molecular en los animales controles ni en los animales con AP (Ver Fig 12, 13 y 14).

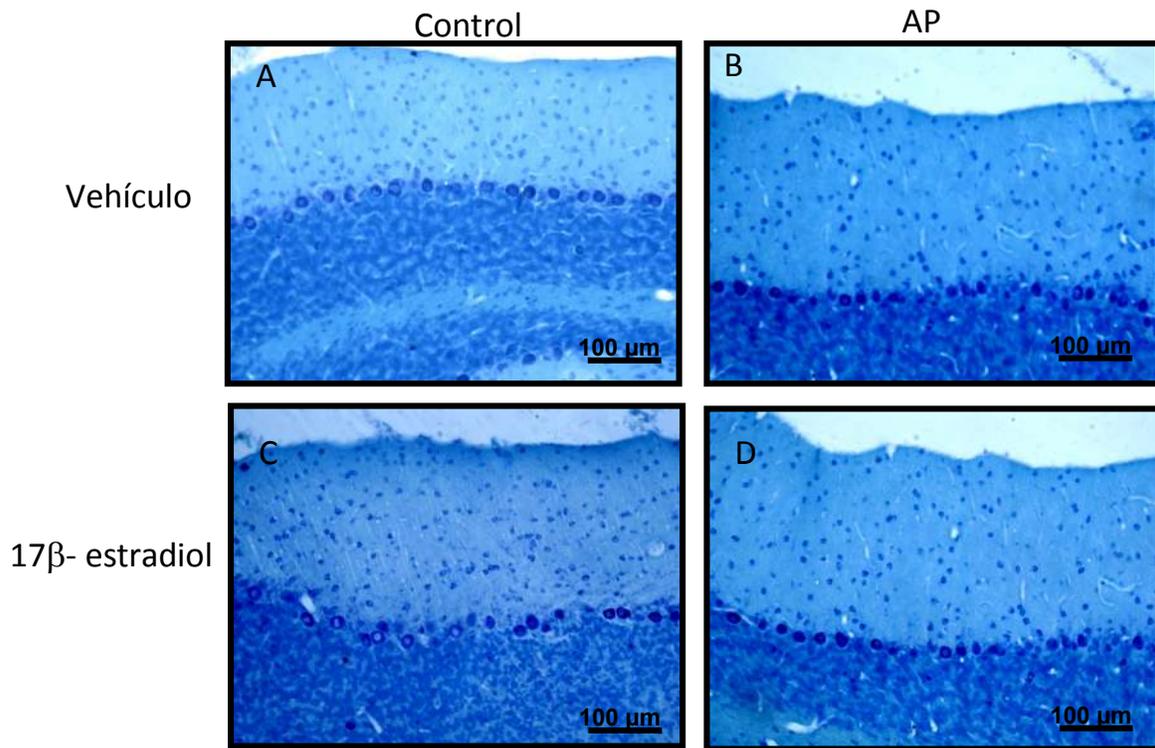


Figura 12: Espesor capa molecular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se muestran fotografías representativas de la capa molecular de cortes teñidos con Azul de Toluidina de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β-estradiol.

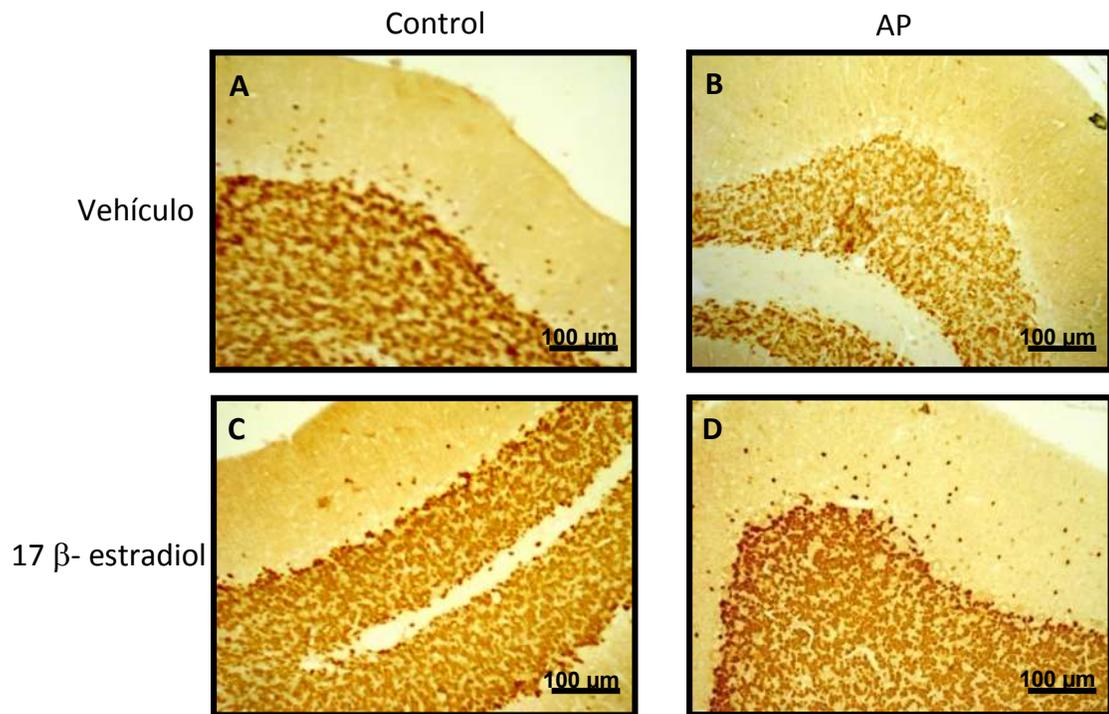


Figura 13: Espesor de la Capa Molecular de la corteza cerebelar en inmunomarcación con anticuerpo anti-NeuN. Se muestra fotografías representativas de la capa molecular de cortes de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β-estradiol.

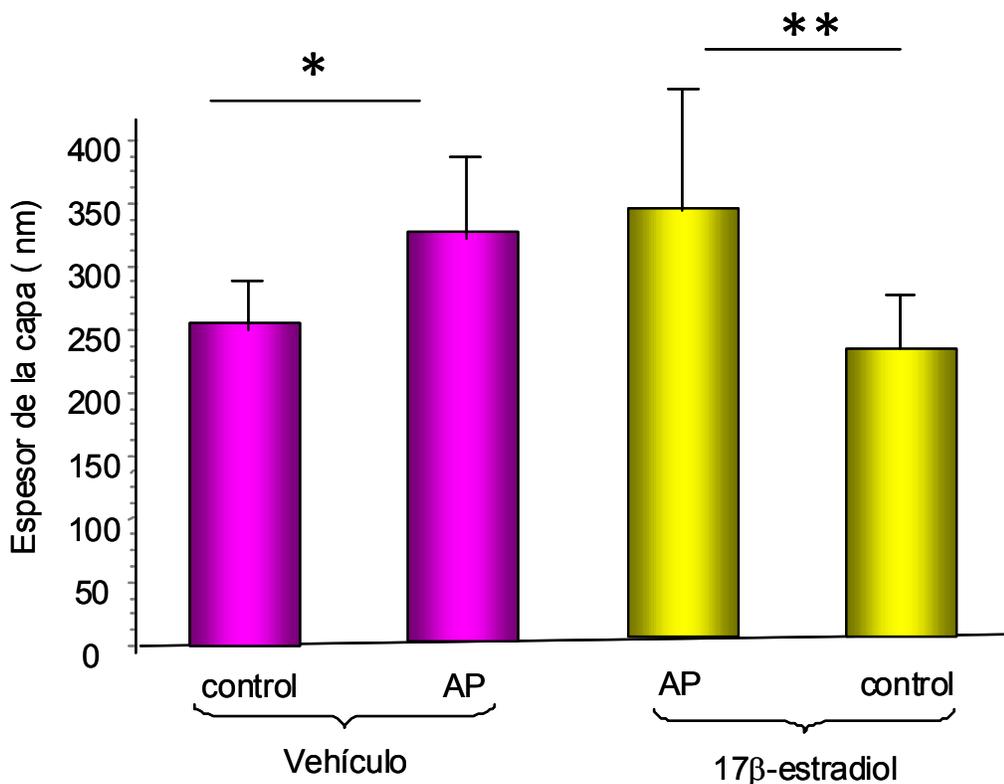


Figura 14: Determinación del espesor de la capa molecular de la corteza cerebelar. El espesor fue medido en imágenes de los cortes teñidos con Azul de Toluidina, utilizando el programa Image J. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.1.2 Número de células en la capa Molecular

El número de células en la capa molecular, las cuales incluyeron interneuronas (células en cesta y estrelladas) y de la glía fueron cuantificadas como núcleos azules toluidina positivos presentes en una superficie de 0,1 mm² (Figura 15). Los resultados revelaron una reducción de 18,7% en la densidad celular en animales AP en comparación con los controles ($p < 0,001$) (Figura 16). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los controles y los animales AP cuando el número de células en cada grupo se multiplicó por el espesor de la capa molecular correspondiente, indicando que no hubo reducción en el número total de células en la capa molecular del cerebelo de ratas AP (Figura 17).

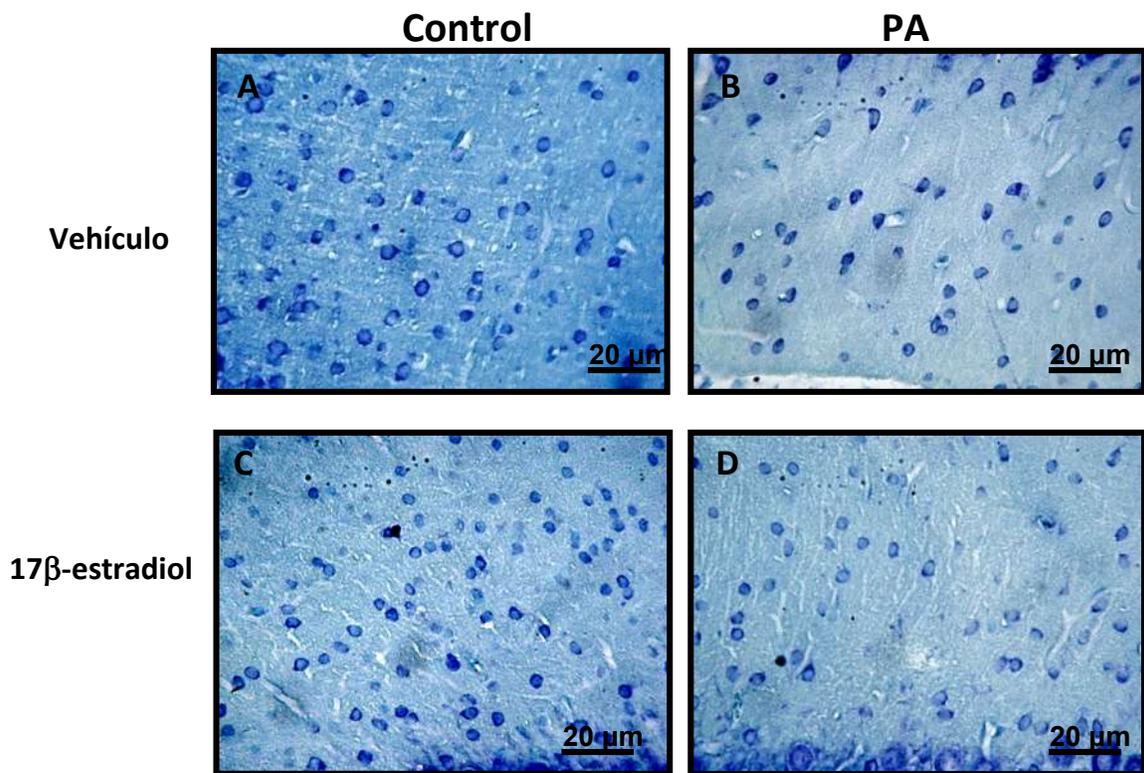


Figura 15: Células en la capa molecular de la corteza cerebelar. Se muestra fotografías representativas de la capa molecular de cortes teñidos con Azul de Toluidina de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β-estradiol.

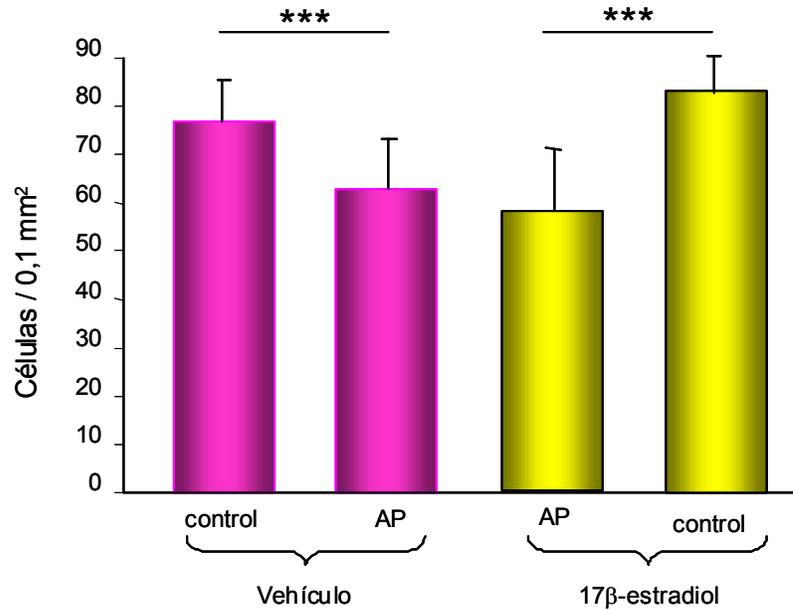


Figura 16: Densidad celular en la capa molecular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se cuantificó el número de células en un área de 0,1 mm. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. *** $p < 0,001$.

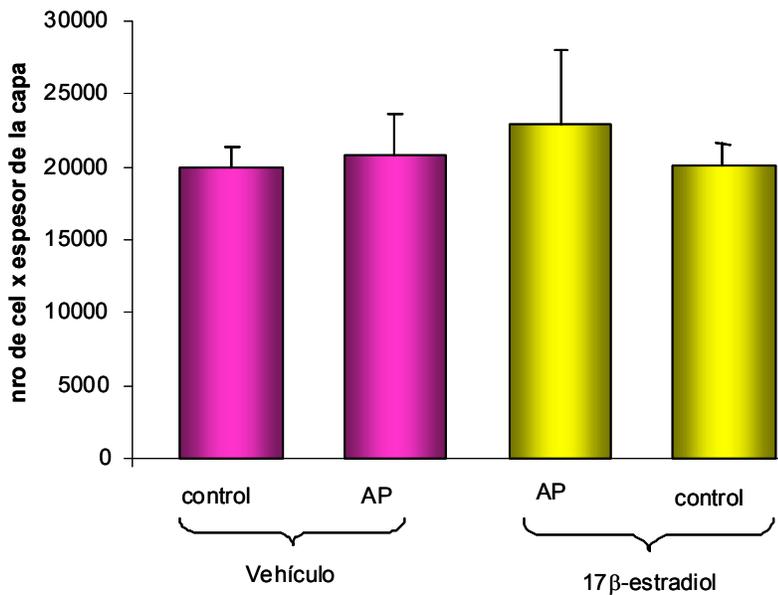


Figura 17: Número total de células en la capa molecular de la corteza cerebelar. Con el propósito de estimar si hubo variación en el número total de células en la capa molecular, se multiplicó el número de células contadas a partir de cortes teñidos con Azul de Toluidina en un área de 0,1 mm por el espesor promedio de la capa correspondiente a cada grupo de animales. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. No hubo diferencias significativas entre los grupos de animales.

4.1.3 Capa granular interna

4.1.3.1 Espesor de la capa granular interna

El espesor de la capa granular interna también se midió en fotografías de cortes de cerebelos teñidos con azul de toluidina (Figuras 18 y 21) y de cortes sometidos a inmunomarcación con anticuerpos anti-NeuN (Figura 19 y 22). En este caso, y teniendo en cuenta la heterogeneidad observada en esta capa, discriminamos entre las mediciones registradas en las circunvoluciones cerebelosas y los registrados en los surcos.

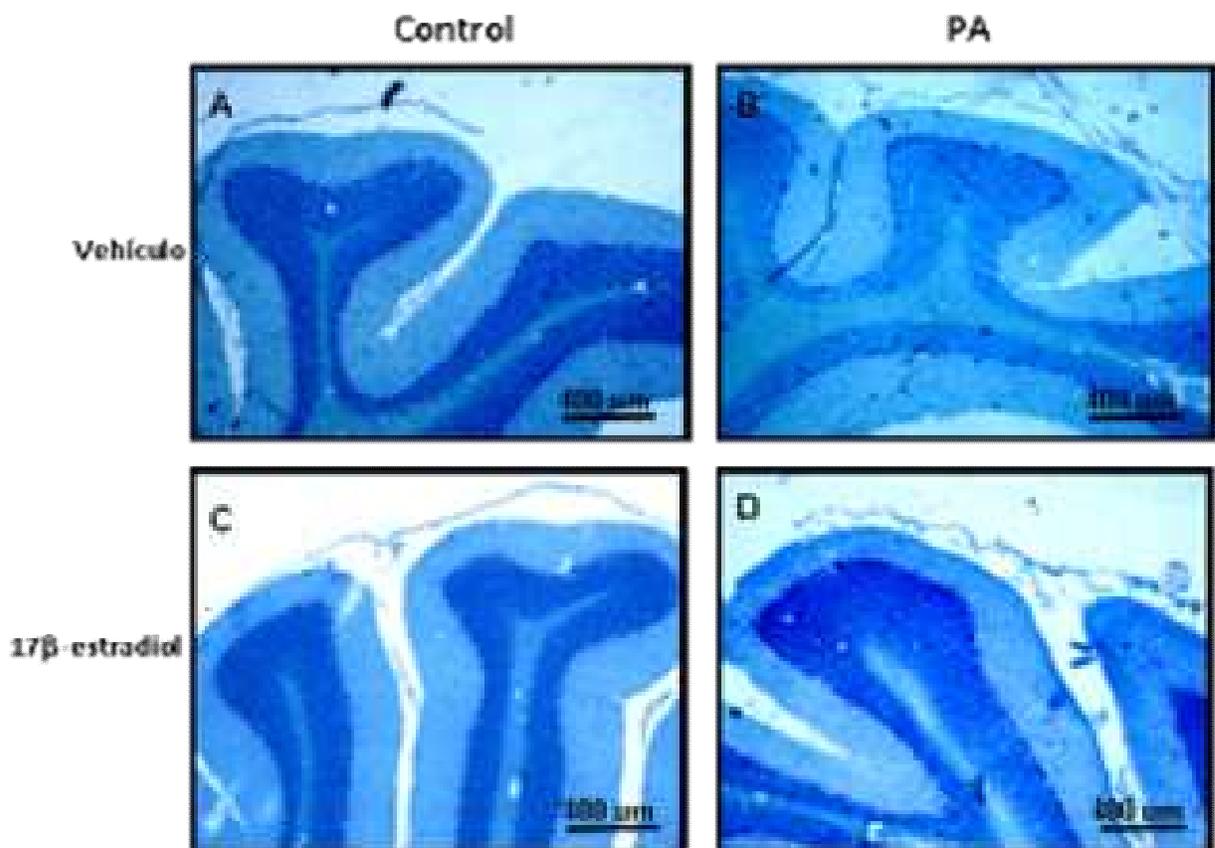


Figura 18: Espesor de la circunvolución de la capa granular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se muestran fotografías representativas de la circunvolución de la capa granular de la corteza cerebelar de cortes teñidos con Azul de Toluidina de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β-estradiol.

Cuando se analizó el espesor de la capa granular en la zona de las circunvoluciones (ver microfotografías representativas de circunvoluciones en la Figura 18 y 19), se determinó que la misma era significativamente más gruesa ($p < 0,05$) en el grupo de AP en comparación con los controles.

Por otro lado, el tratamiento con estradiol no modificó el espesor de la capa granular en las circunvoluciones en los animales controles ni en los animales con AP (Ver Fig 18, 19 y 20).

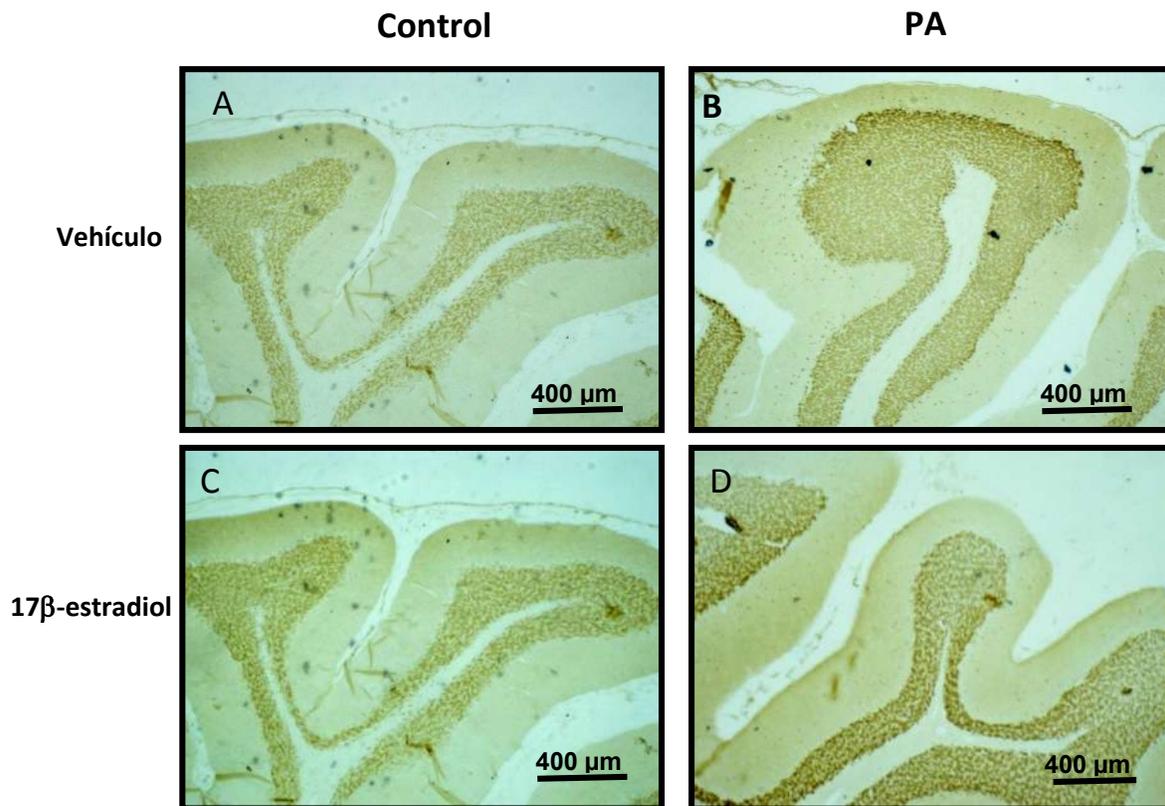


Figura 19: Espesor de la circunvolución de la capa granular de la corteza cerebelar en inmunomarcación con anticuerpo anti-NeuN. Se muestran fotografías representativas de la capa molecular de cortes de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β -estradiol.

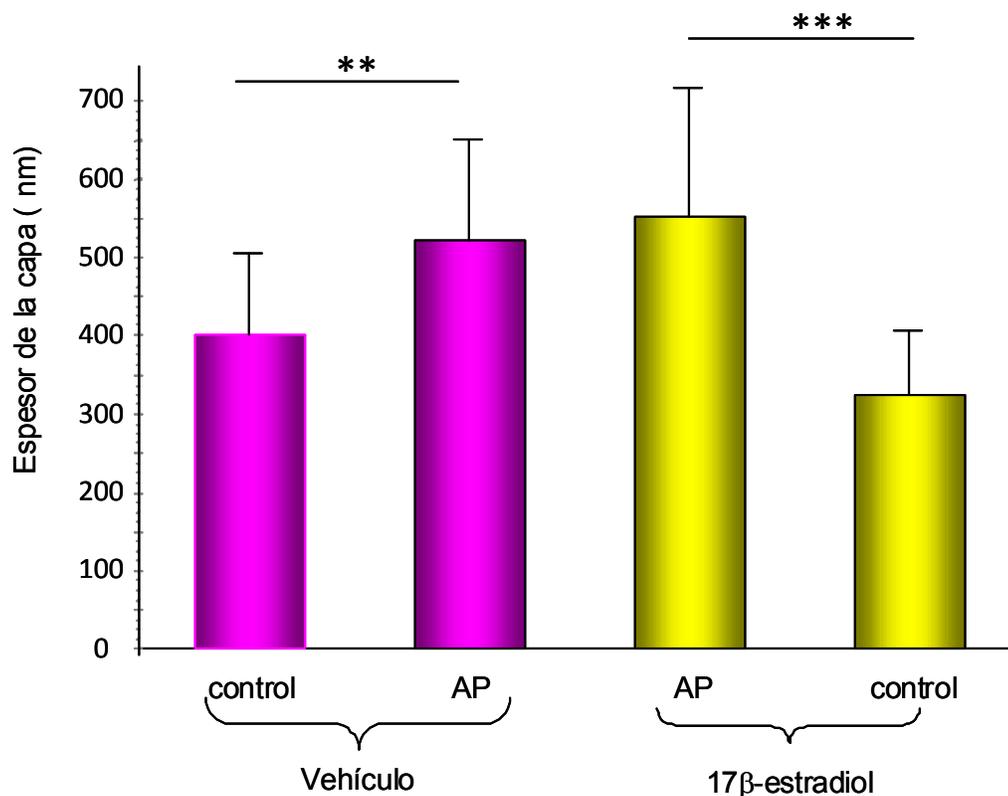


Figura 20: Determinación del espesor de la capa granular en las circunvoluciones de la corteza cerebelar. El espesor fue medido utilizando el programa Image J a partir de las imágenes teñidas con azul de toluidina. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$

Posteriormente se analizó el espesor de la capa granular en la zona de los surcos (Ver micrografías representativas en figuras 21 y 22). Los resultados de las mediciones indicaron que, también en esta zona, la AP produce un incremento significativo ($p < 0,01$) del espesor de la capa (Figura 23).

Al igual que lo determinado anteriormente, el tratamiento de los animales con 17β-estradiol no produjo modificación en el espesor de la capa granular en la zona de los surcos.

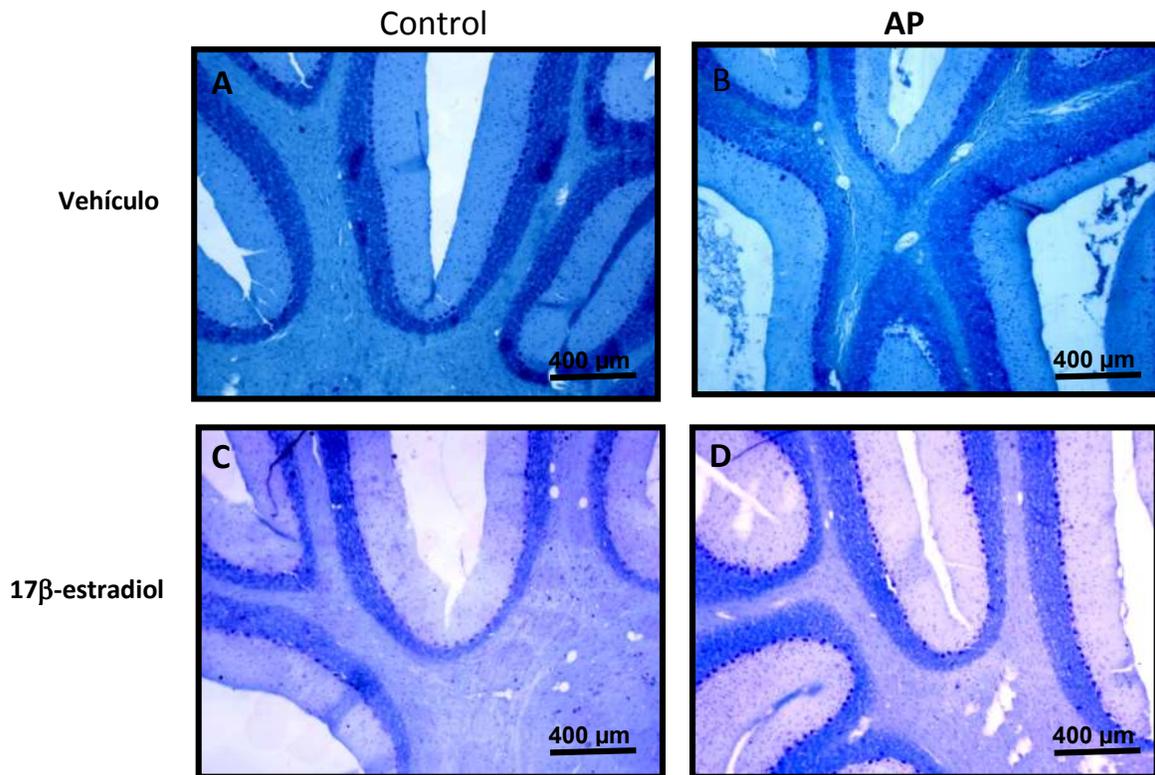


Figura 21: Espesor del surco de la capa granular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se muestran fotografías representativas del surco de la capa granular de la corteza cerebelar de cortes teñidos con Azul de Toluidina de cerebelos de animales controles y AP tratados con 17 β-estradiol o con su vehículo.

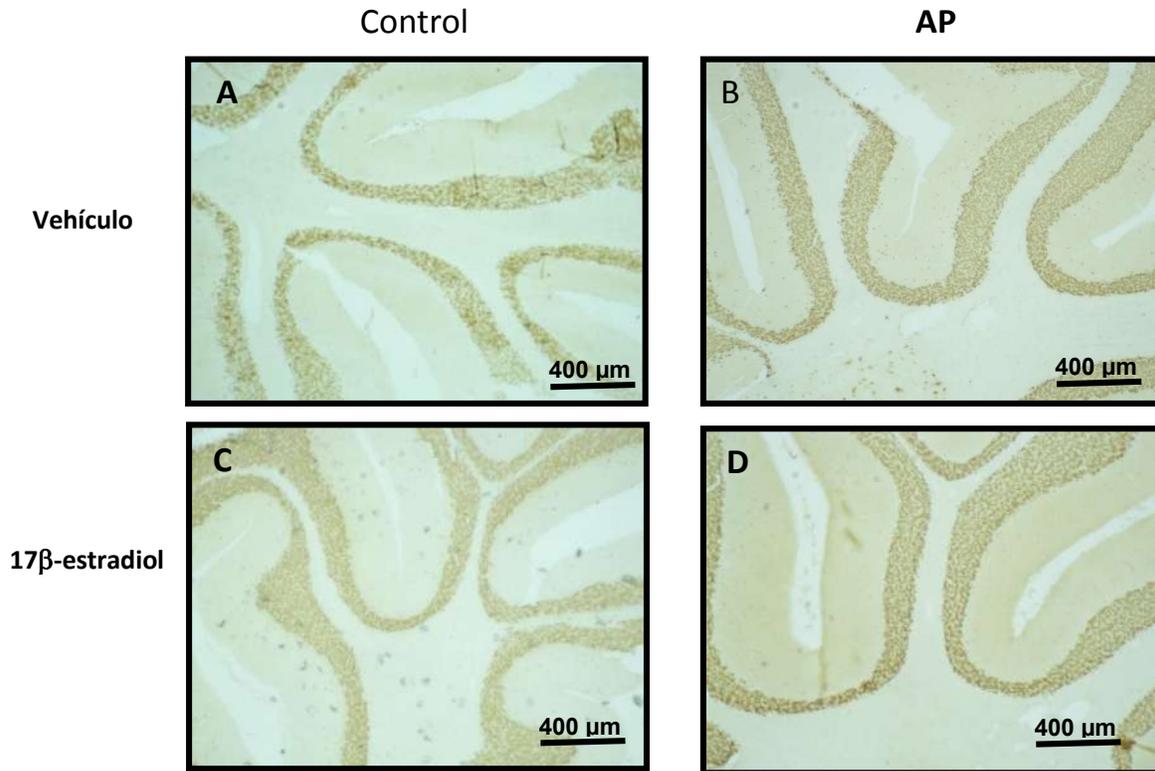


Figura 22: Espesor de la capa granular de la corteza cerebelar en los surcos en inmunomarcación con anticuerpo anti-NeuN. Se muestran fotografías representativas de la capa granular de cortes de cerebelos de animales controles y AP tratados con 17 β-estradiol o con su vehículo.

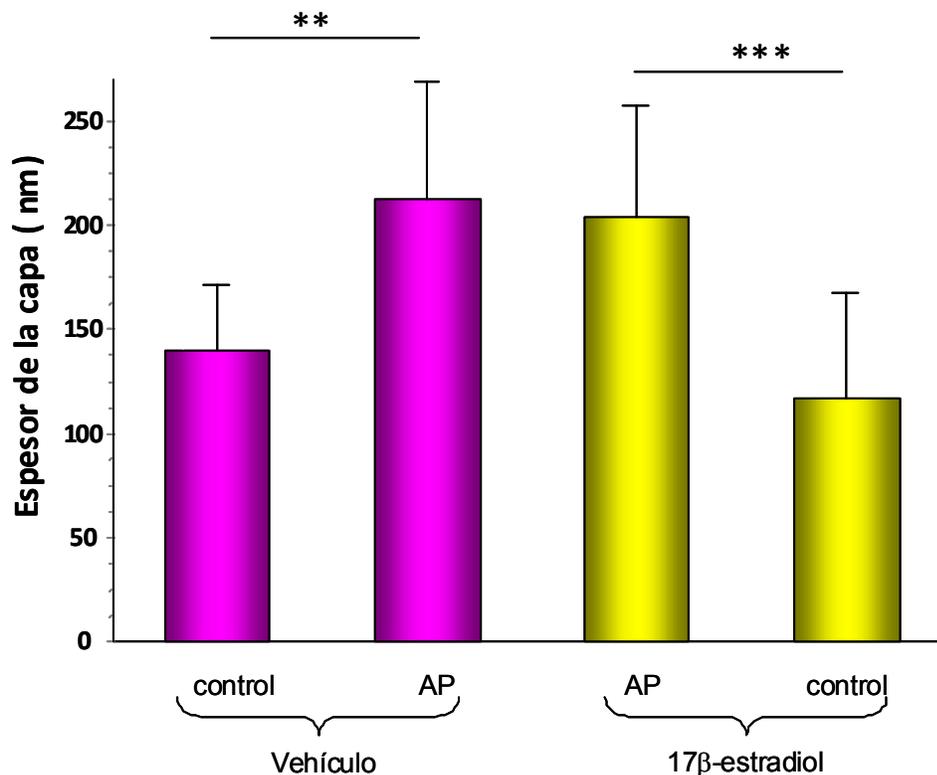


Figura 23: Determinación del espesor de la capa granular en los surcos de la corteza cerebelar. El espesor fue medido utilizando el programa Image J a partir de las imágenes teñidas con Azul de Toluidina. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$

También se evaluó en la capa granular el número de células teñidas de azul de toluidina, es decir, granular, Golgi y células gliales, en un área de $0,2 \text{ mm}^2$ (Figura 24). Se determinó que los animales AP mostraron una reducción de 27,5% en la densidad celular en comparación con los controles ($p < 0,001$) (Figura 25). No hubo diferencias entre los animales AP y controles luego del tratamiento con E2. Sin embargo, cuando el número de células en cada grupo se multiplicó por el espesor medio de la capa granular, no se obtuvieron diferencias significativas entre el control y los animales AP, lo que evidencia que no se produjo ninguna reducción en el número total de células de la capa granular en ratas AP (Figura 26).

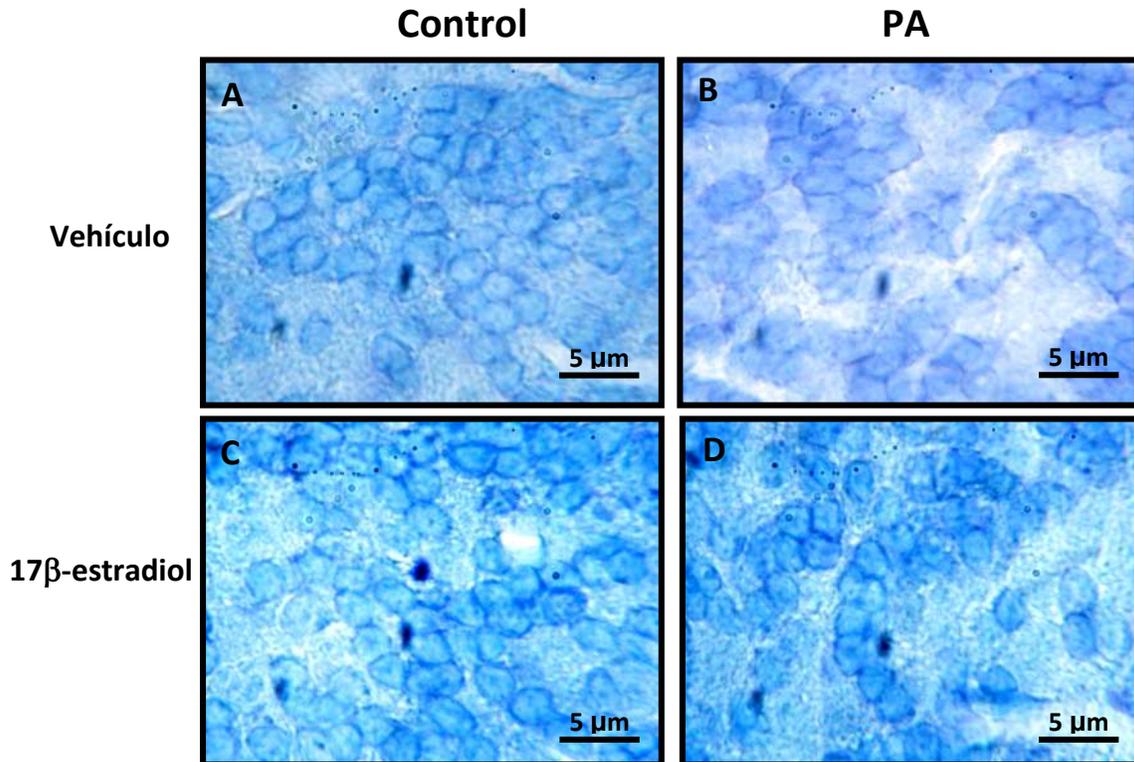


Figura 24: Células en la capa granular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se muestran fotografías representativas de la capa granular de cortes teñidos con Azul de Toluidina de cerebelos de animales controles y AP tratados o no con 17 β-estradiol.

Desde el punto de vista morfológico, los núcleos de las neuronas de la capa granular del cerebelo normóxico se mostraron redondeados, homogéneamente teñidos, mientras que hubo un mayor porcentaje de núcleos dismórficos (ovales, poligonales) en los cerebelos de ratas que habían sufrido el insulto asfíctico.

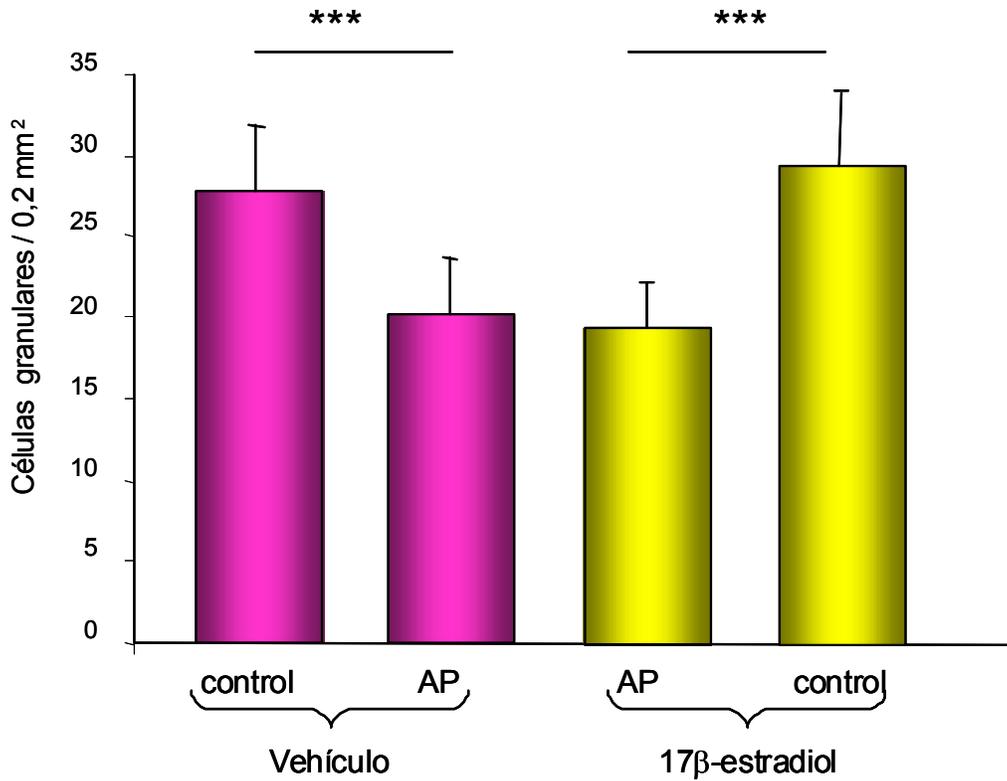


Figura 25: Densidad celular en la capa granular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Se cuantificó el número de células en un área de 0,2 mm. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. * $p < 0,001$.**

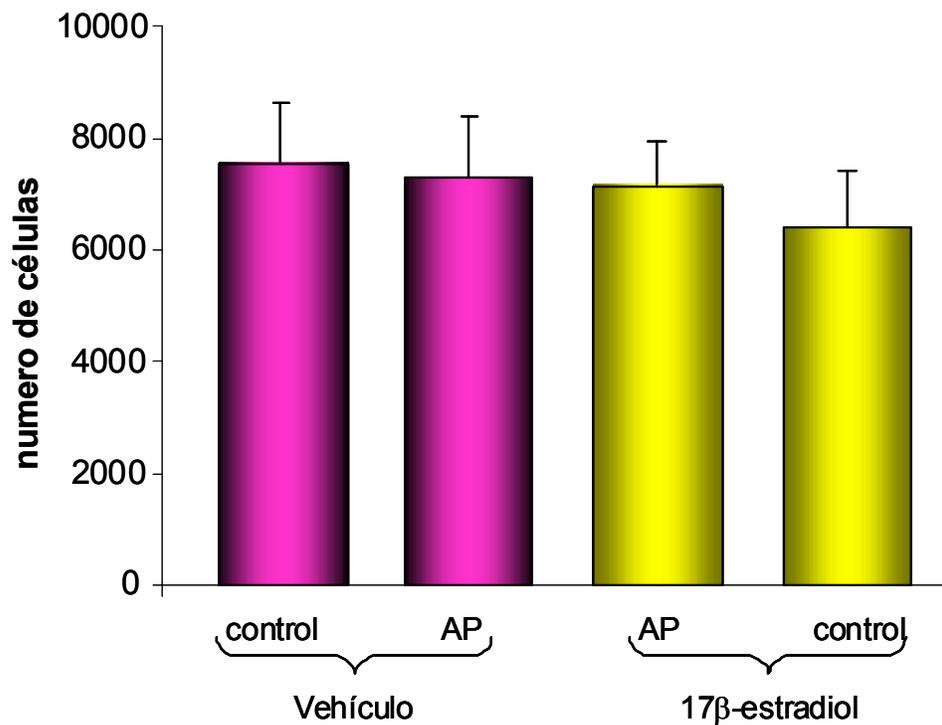


Figura 26: Número total de células en la capa granular de la corteza cerebelar teñida con Azul de Toluidina. Con el propósito de estimar si hubo variación en el número total de células en la capa granular, se multiplicó el número de células en un área de 0,2 mm² por el espesor promedio de la capa correspondiente a cada grupo de animales. Los datos se expresan como el promedio ± SD. No hubo diferencias significativas entre los grupos de animales.

4.2 Las células de Purkinje

Las células de Purkinje (PC) constituyen las únicas neuronas de salida en la corteza cerebelosa y por lo tanto tienen un papel funcional central en la integración. Por esta razón, se analizó el número de PC, la distribución y la morfología por medio de la inmunotinción con anticuerpo anti-calbindin y Azul de Toluidina. En cuanto a la morfología de la capa de PC, animales PA mostraron una distribución desordenada, en el que algunas áreas aparecieron como una

doble capa y otras presentaron brechas de PC o conglomerados de las mismas (Figura 27 y 28).

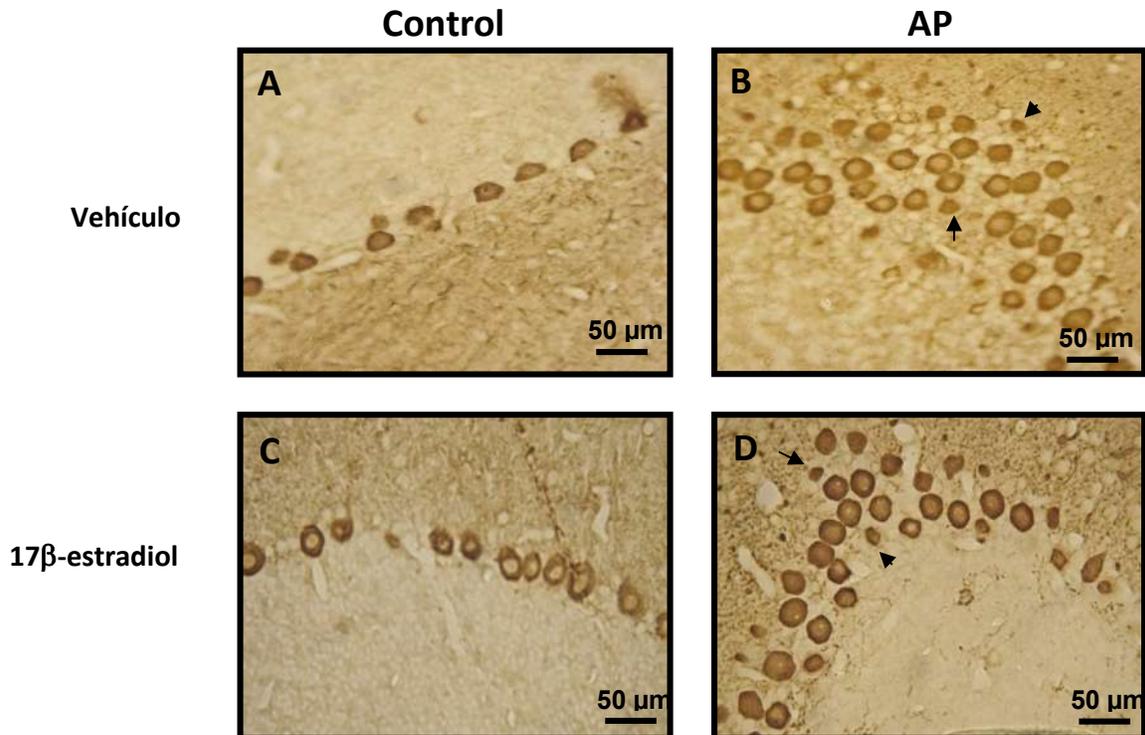


Figura 27: Células de Purkinje (PC) visualizadas mediante inmunotinción usando anticuerpo anti-Calbindina Se muestran fotografías representativas de la capa de células de Purkinje de animales controles y AP respectivamente. En animales AP las PC mostraron una distribución desordenada, en algunas zonas aparecen como multicapa o conglomerados de PCs. Se evidencian células con morfología alterada (señaladas con una flecha).

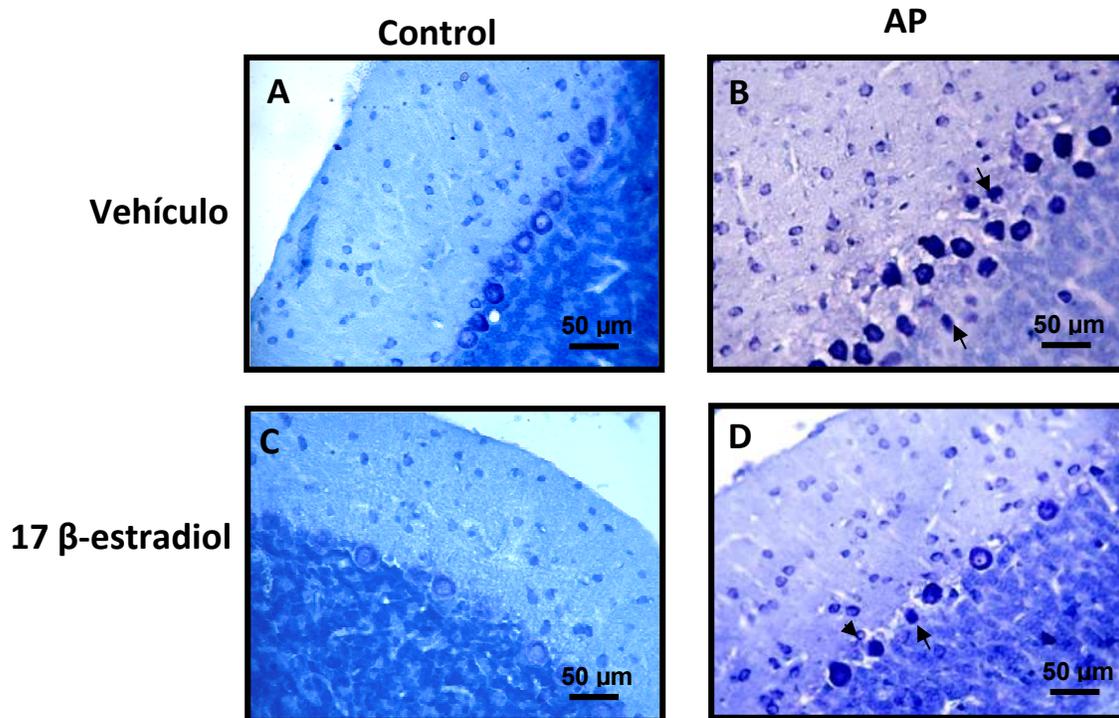


Figura 28: Células de Purkinje (PC) visualizadas mediante tinción con Azul de Toluidina Se muestran fotografías representativas de la capa de células de Purkinje de animales controles y AP tratados con 17 β -estradiol o su vehículo. En animales AP la capa de las PCs mostraron una distribución de las células desordenada, en algunas zonas aparecen formando multicapa o conglomerados, mientras que en otras se encuentran ausentes. Se evidencian células con morfología alterada (señaladas con una flecha).

Además, se determinó el número de las PCs en el cerebelo de animales control, PA y luego del tratamiento con Estradiol. Para ello, se contó las células calbindinas-positivas presentes en 1 mm de la capa de las PCs (densidad lineal). También se realizó una discriminación entre las células que presentaron tinción de calbindina somática normal de las que mostraron una tinción irregular para la misma, tales como tinción débil o de acentuada localización somática, o incluso la falta de tinción en el soma celular.

En cuanto al número total de PCs, no se detectaron alteraciones significativas en el cerebelo de animales AP en comparación con los controles

(Figura 29). Sin embargo, se evidenció un mayor número de PCs con alteraciones en la distribución de calbindina en ratas AP ($p < 0,01$, (Figura 30). Se obtuvieron resultados similares cuando estas evaluaciones se llevaron a cabo a partir de los cortes teñidos con azul de toluidina (no mostrado).

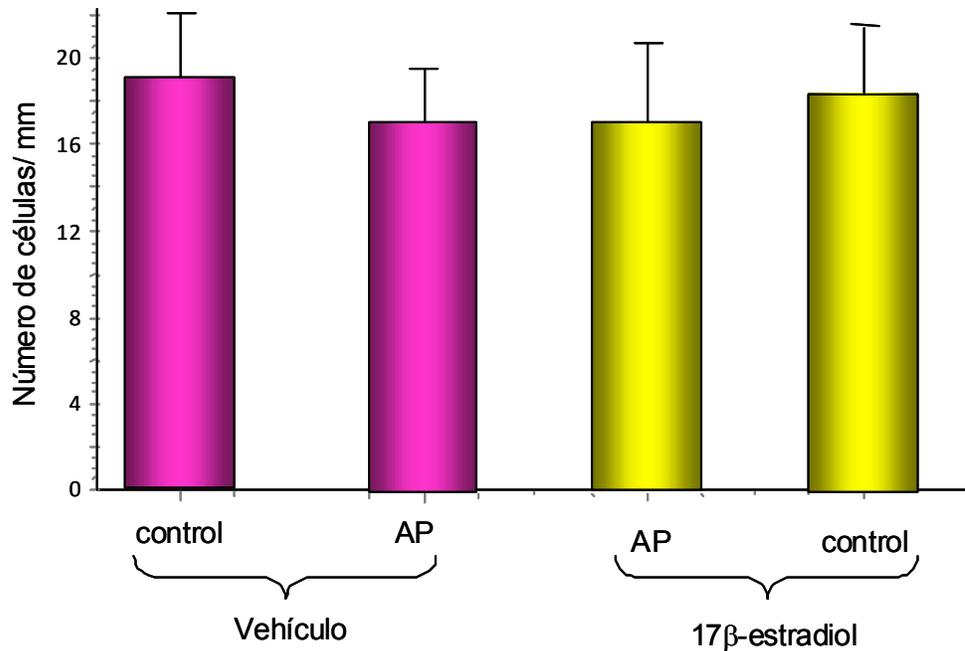


Figura 29: Cuantificación del número de Células de Purkinje (PC). Para cuantificar el número PCs por mm lineal, se partió de las fotografías tomadas de cortes teñidos con Azul de Toluidina. Se realizó utilizando el programa Image J. Los datos se expresan como el promedio \pm SD. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

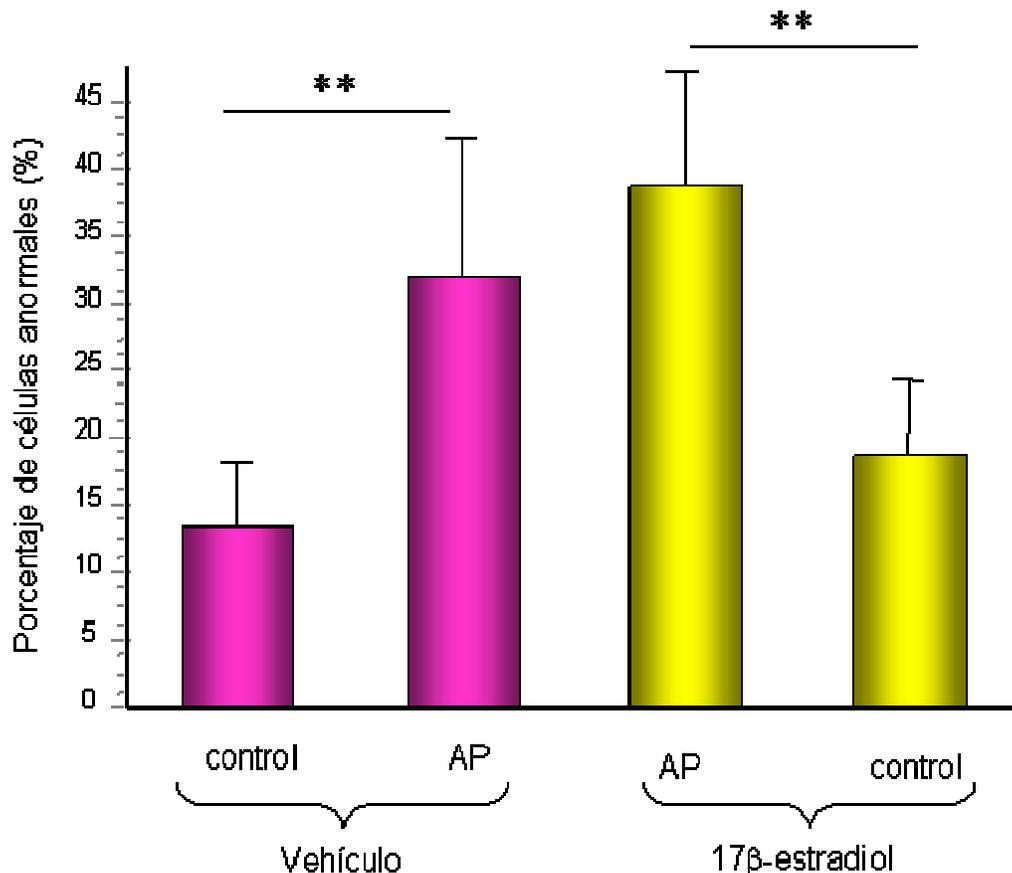


Figura 30: Cuantificación del número de Células de Purkinje (PC) anormales. Para cuantificar el porcentaje de PCs anormales, se partió de las fotografías tomadas de cortes inmunoteñidos utilizando anticuerpo anti-calbindina. Se consideraron células anormales aquellas que presentaron tinción con calbindina irregular, tales como tinción débil o falta de marcación somática, así como intensa y homogénea marcación. Los datos representan el promedio \pm SD. ** $p < 0.01$.

Dado que detectamos un mayor porcentaje de PCs con distribución anómala de calbindina, y dado el importante papel de esta proteína en la homeostasis del calcio, es que estudiamos su expresión en cerebelos de ratas control AP y tratadas o no con E2 por Western blot (Figura 31).

Se pudo evidenciar una disminución significativa ($p < 0,05$) en la expresión de calbindina en los animales AP en comparación con la de los cerebelos de

animales controles. Por otro lado, el tratamiento con E2, produjo un incremento significativo en la expresión tanto en cerebelos de animales controles como en los que sufrieron AP.

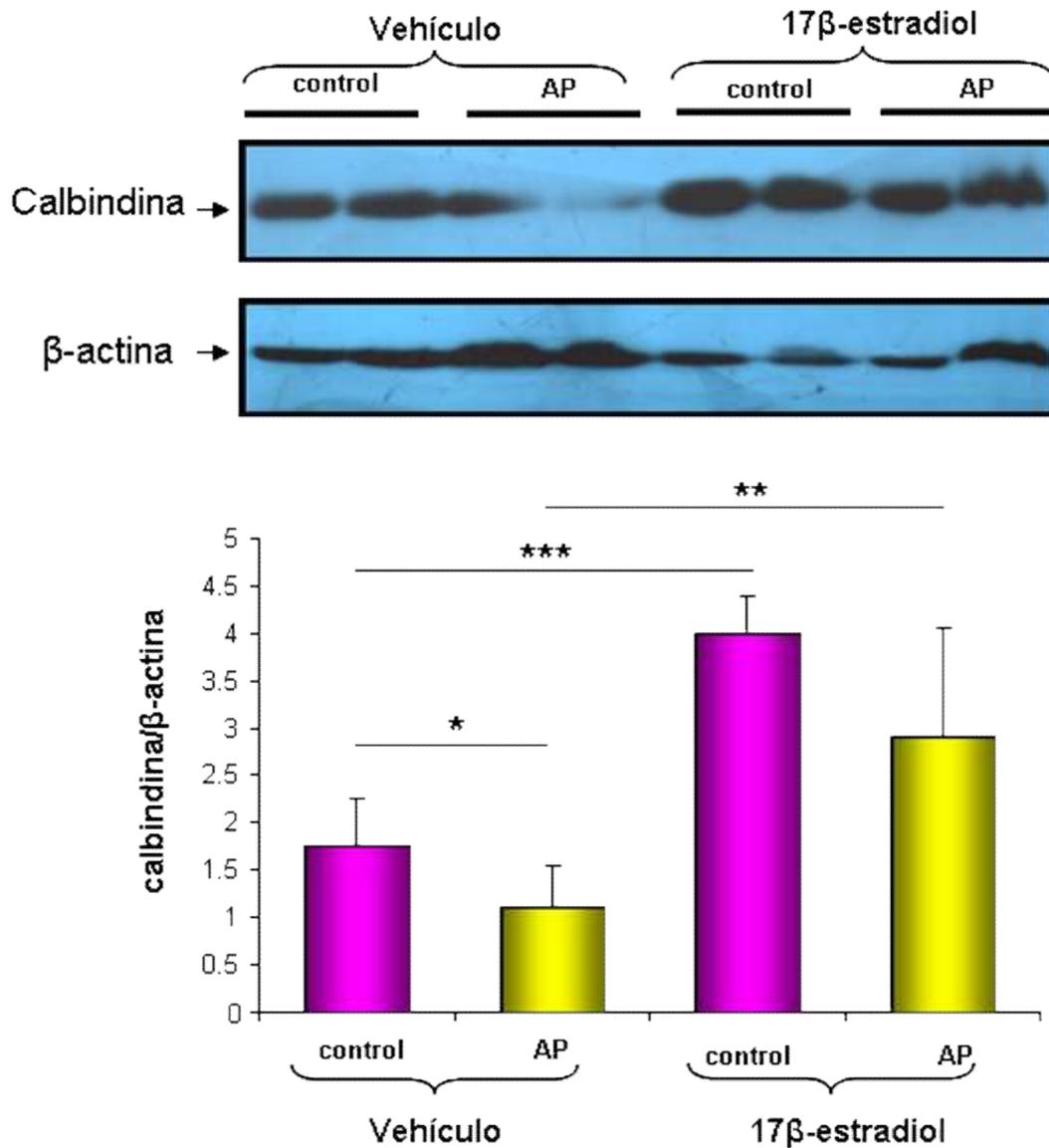


Figura 31: Expresión de Calbindina en cerebelo: Panel A muestra el resultado representativo de un Western blot utilizando anticuerpo anti-Calbindina en muestras de cerebelo. Se utilizó la señal de actina como control de carga.

Panel B: muestra el resultado de la cuantificación relativa de las bandas de calbindina y actina de tres experimentos diferentes. Los datos representan el promedio \pm SD. . * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

4.3 Morfología Dendrítica

Con el fin de estudiar la morfología de las dendritas de las PCs, se llevó a cabo una inmunodetección de MAP-2 y se analizó la capa molecular. Animales sometidos a AP mostraron dendritas con inflamación focal y marcada fragmentación de MAP-2 en comparación con los animales control (Figura 32).

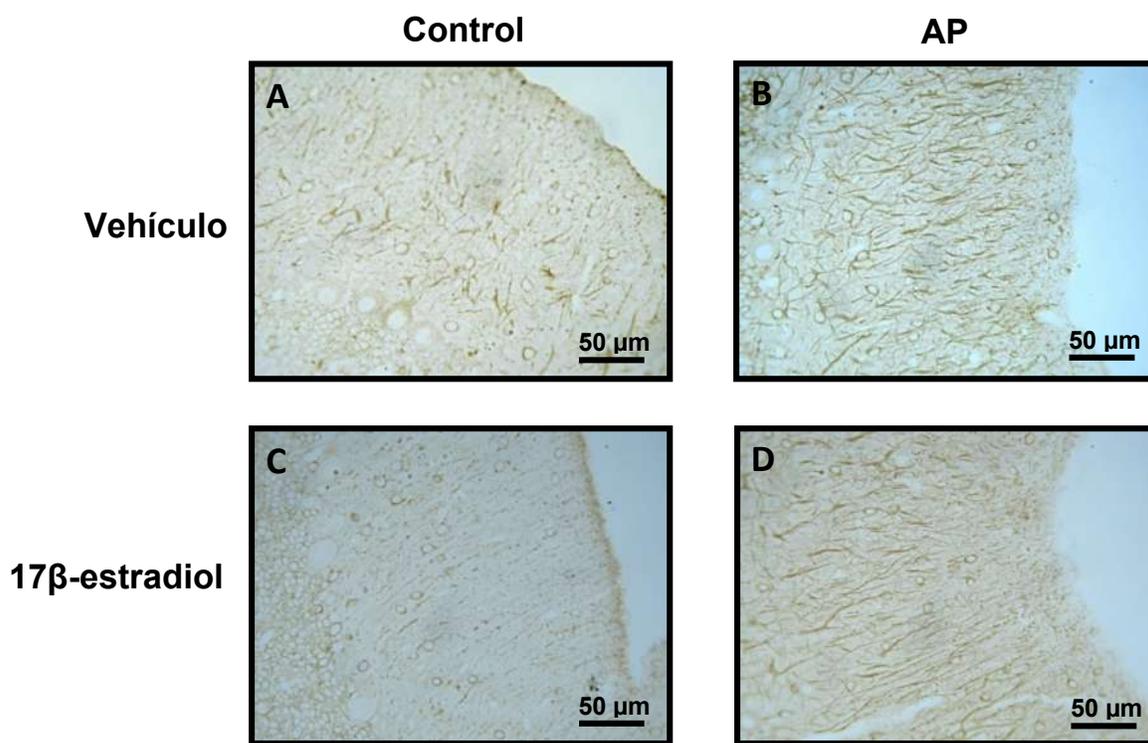


Figura 32: Detección de las dendritas de las células de Purkinje por inmunomarcación de MAP-2. Se muestran fotografías representativas de la capa molecular. Se observa dendritas con inflamación focal y marcada fragmentación de MAP-2 en los las muestras provenientes de animales sometidos a AP en comparación con los animales controles.

Además, y con el fin de analizar ramificación dendrítica, se determinó la zona reactiva de MAP-2 en cada una de las siguientes secciones de igual tamaño de la capa molecular: 1) interna, más cercana a la capa de PC (Figura 33, A), 2) media (Figura 33, B), y 3) externa (Figura 33, C). Los análisis estadísticos revelaron un aumento significativo en la zona reactiva en todas las subdivisiones

de la capa molecular estudiadas en animales PA ($p < 0,001$). Por otra parte, y con la intención de evaluar si hubo diferencia en el largo de las dendritas, se analizó la relación entre las áreas internas y externas MAP-2reactivas, no detectándose diferencias significativas con respecto al control. Tampoco hubo diferencias entre las ratas tratadas con E2 (Figura 34).

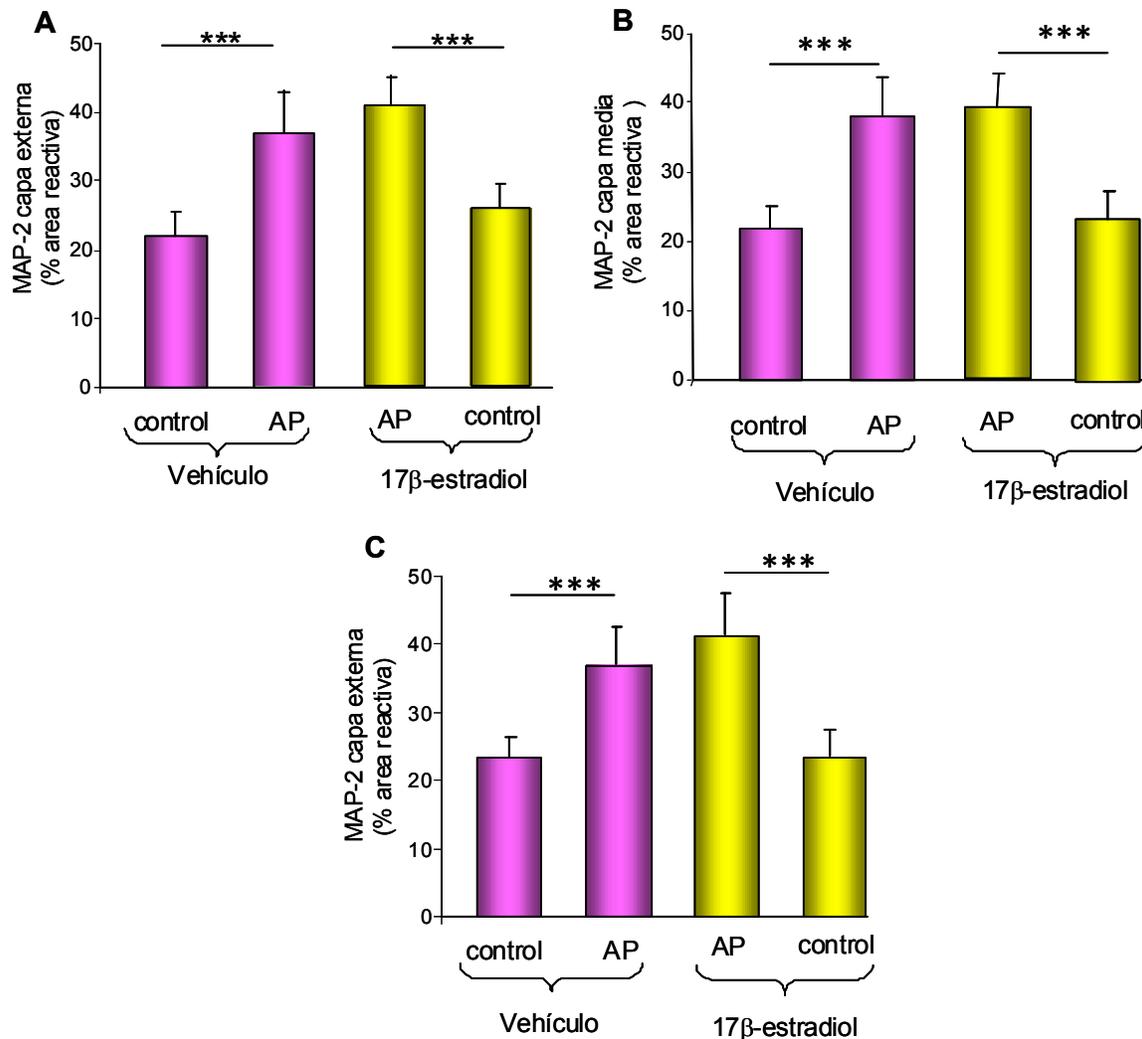


Figura 33: Área reactiva de la inmunotinción de MAP-2. A fin de analizar la ramificación dendrítica, se subdividió la capa molecular en tres secciones iguales y se determinó el área reactiva para MAP-2 en cada una de ellas: 1) interna, más cercana al soma de las PCs (Panel A), 2) media, (Panel B) y 3) externa (Panel C). Los datos representan el promedio \pm SD. *** $p < 0,001$.

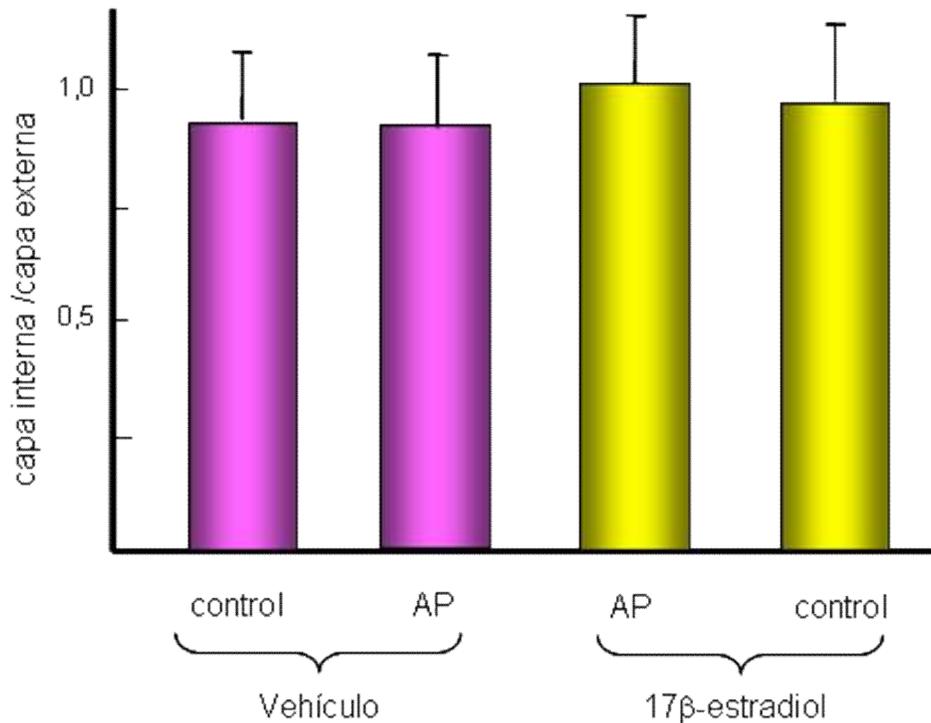


Figura 34: Ramificación dendrítica: A fin de estimar variaciones en la ramificación de las dendritas causadas por la AP se calculó la relación entre las áreas reactivas de la inmuntinción de MAP-2 de las zonas internas y externas para cada tratamiento.

Los datos representan el promedio \pm SD. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

4.4 Los astrocitos

Está bien establecido que los astrocitos proliferan y la expresión de GFAP aumenta en condiciones neurodegenerativas.

El estudio de la morfología astrocitaria por inmunotinción de GFAP mostró un aumento en el área GFAP positivas en las células Bergmann ($p < 0,001$), (Figuras 35 Y 36).

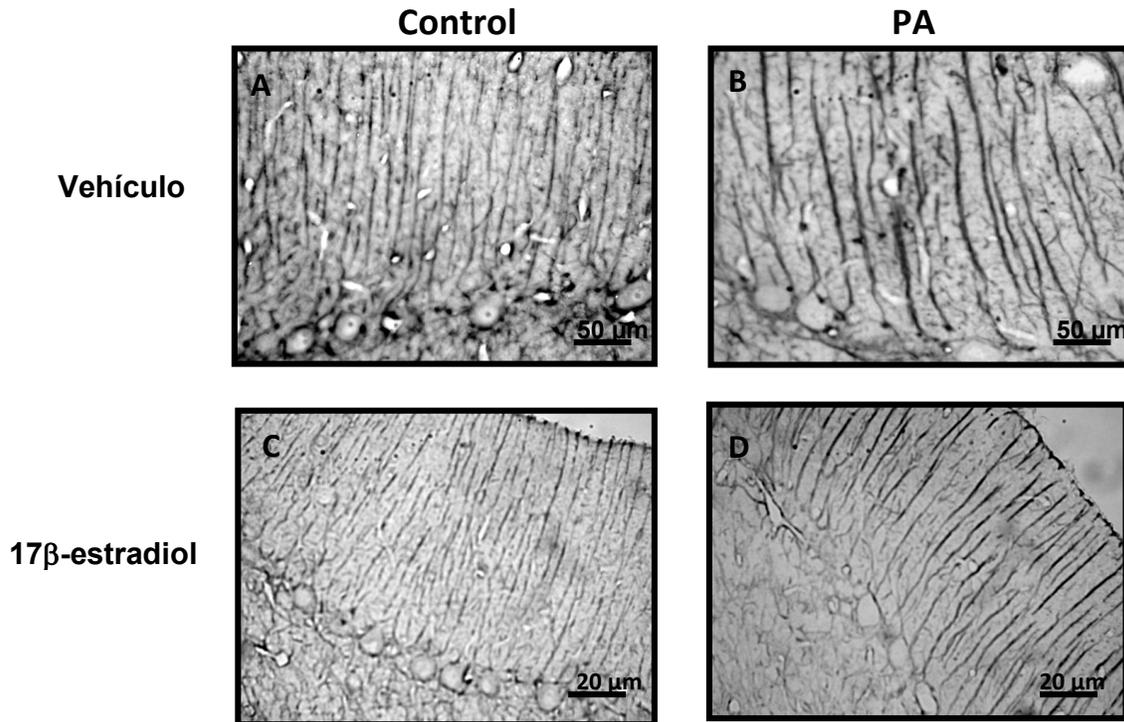


Figura 35: Expresión de GFAP en la capa molecular cerebelar. Se muestran fotografías representativas de la expresión de GFAP correspondiente a las células Bergmann.

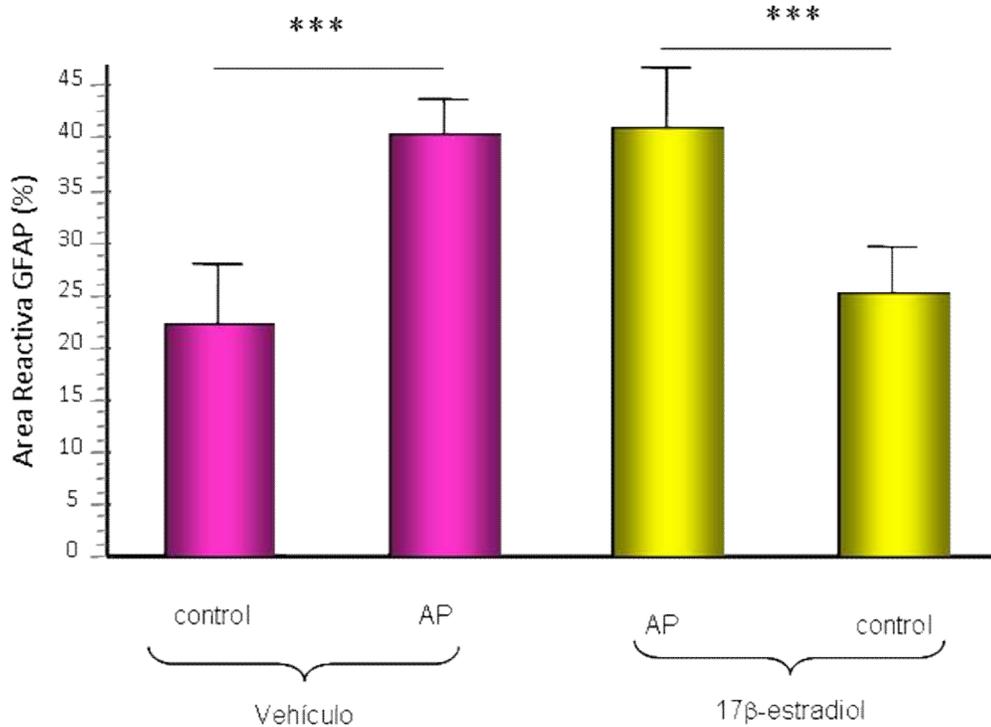


Figura 36: Cuantificación de la expresión de GFAP en la capa molecular cerebelar. Se muestra la cuantificación del área GFAP positiva en la capa molecular. Los datos representan el promedio \pm SD, *** $p < 0.001$.

Por último, la evaluación de los astrocitos GFAP-positivos en la capa granular rindió un aumento en el área reactiva ($p < 0,001$) en los animales PA en comparación con los controles (Figuras 37 y 38).

El aumento en la expresión de GFAP fue corroborada analizándose su expresión en extractos de cerebelos por Western blot (Figura 39 A). Se determinó un incremento significativo ($p < 0,001$) de GFAP en el cerebelo de ratas AP en comparación con los controles (Figura 38 B). Por otro lado, no se observó cambio en la expresión de GFAP en los animales tratados con E2 en el análisis de las Inmunotinciones y del Western-Blot.

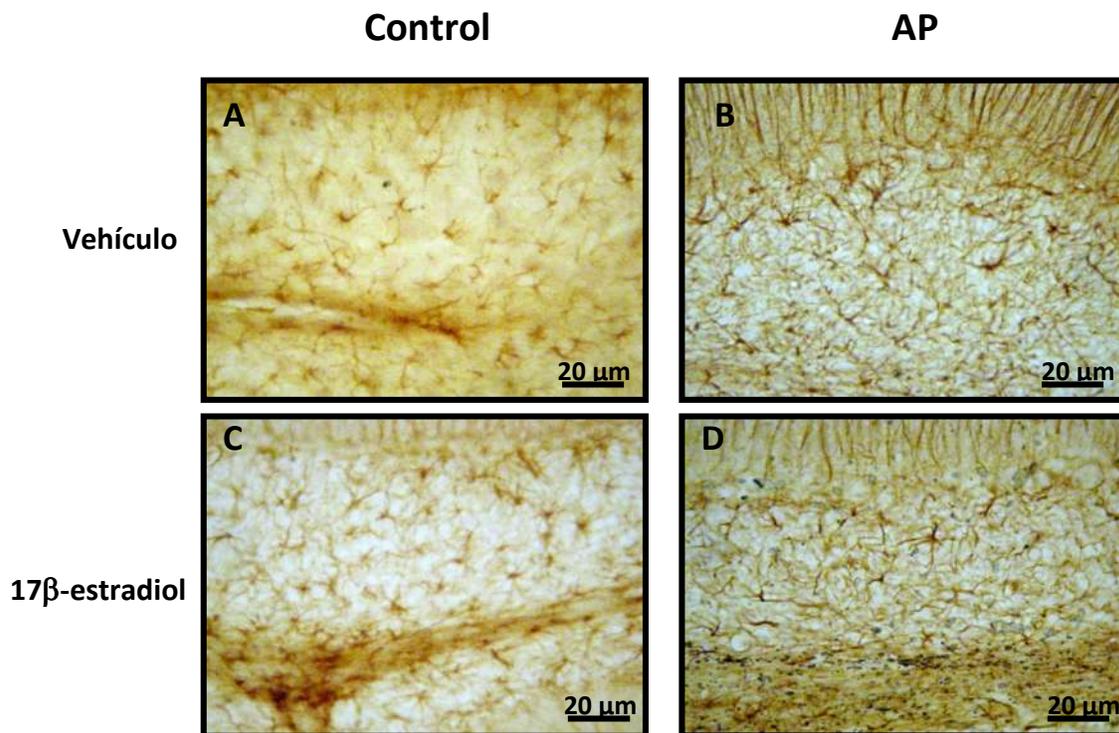


Figura 37: Expresión de GFAP en la capa granular de la corteza cerebelar. Se muestran fotografías representativas de la expresión de GFAP correspondiente a los astrocitos de la capa granular.

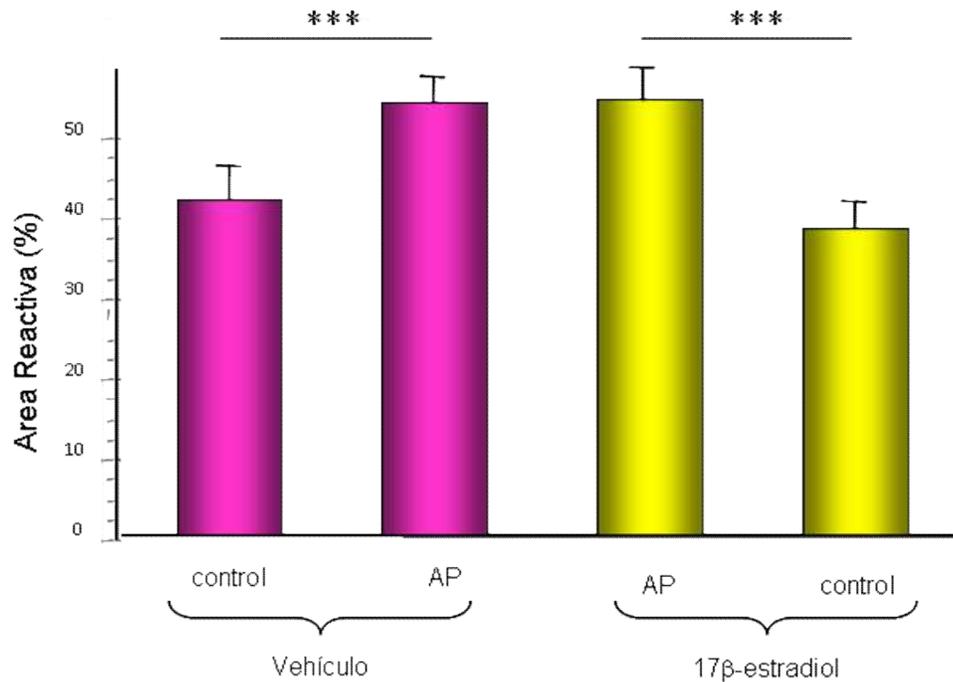


Figura 38: Cuantificación de la expresión de GFAP en la capa granular de la corteza cerebelar Se muestra la cuantificación del área GFAP positiva en la capa granular. Los datos representan media \pm SD, *** $p < 0.001$.

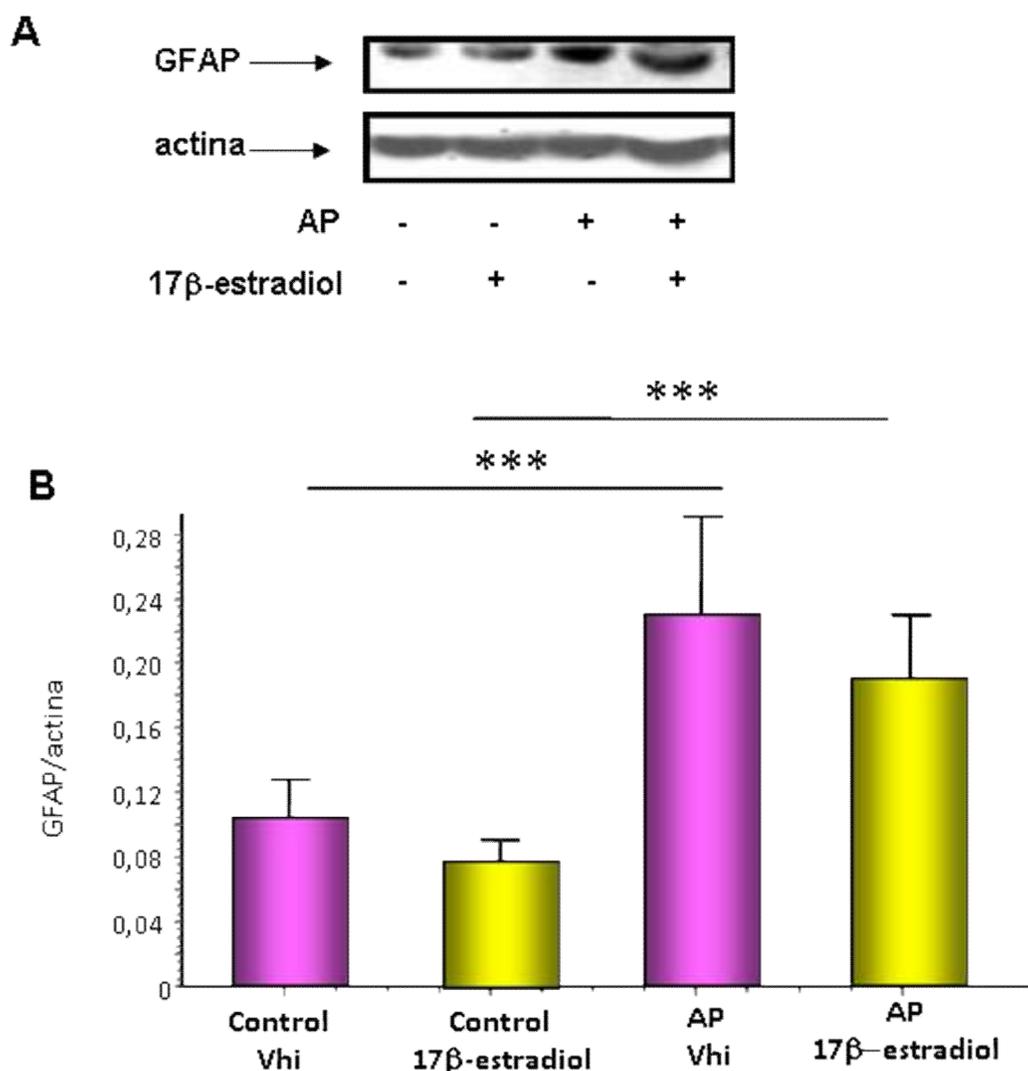


Figura 39: Expresión de GFAP en cerebelo. Panel A muestra el resultado representativo de un Western blot utilizando anticuerpo anti-GFAP en muestras de cerebelo. Se utilizó la señal de actina como control de carga. Panel B: muestra el resultado de la cuantificación relativa de las bandas de GFAP y actina de tres experimentos diferentes. Los datos representan el promedio \pm SD, *** $p < 0.001$.

4.5 Apoptosis

Con la intención de determinar si el E2 al tiempo analizado, produce modificación en la apoptosis estudiamos en los cerebelos la expresión de la proteína Bcl-2, antiapoptótica y de Bax, proapoptótica por Western blot (Figura 40 A). Se analizó la relación Bcl-2/Bax y no se observó diferencias entre los controles y los animales AP. Sólo se observó un índice significativamente mayor ($p < 0,05$) en los animales tratados con E2 (Figura 40 B).

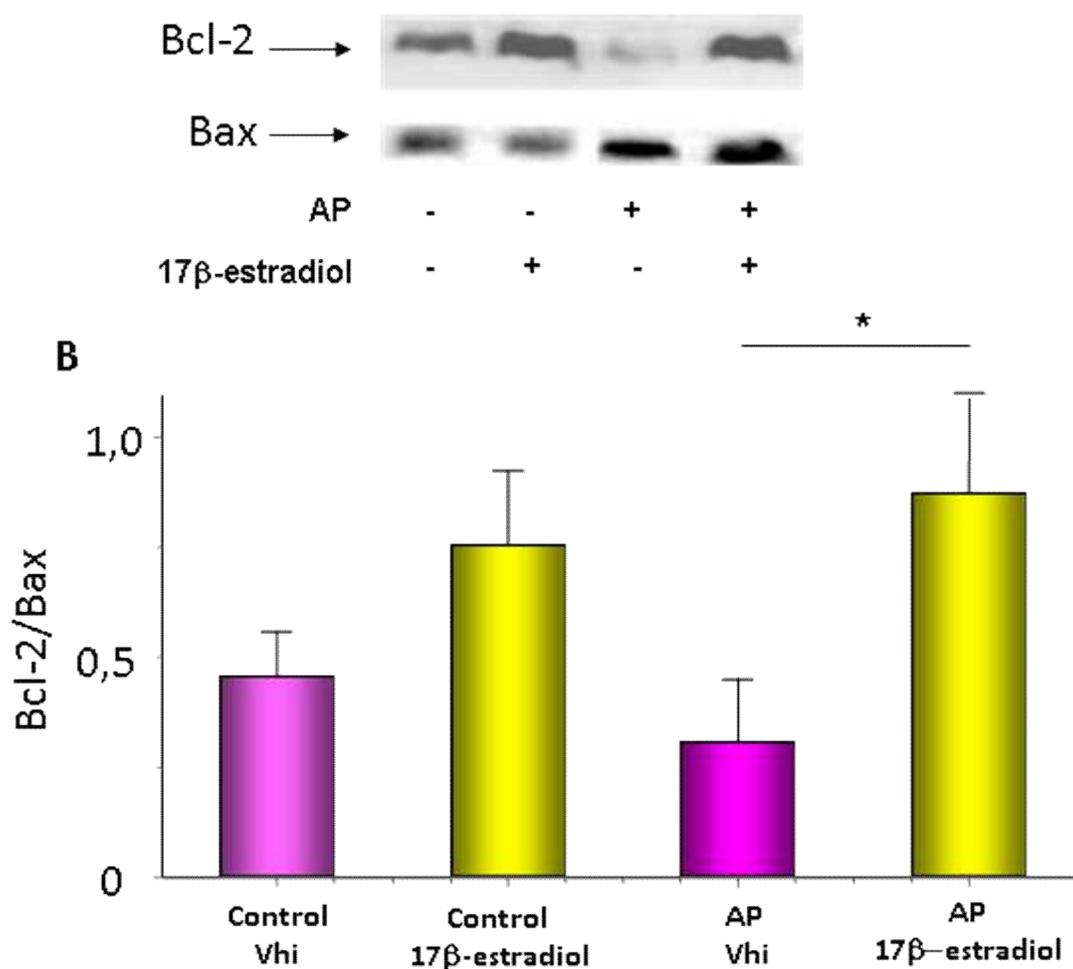


Figura 40: Expresión de Bcl-2 y Bax en cerebelo. Panel A: se muestra Western-blot representativos de Bcl-2 y Bax. Panel B: muestra la cuantificación de la relación Bcl-2/Bax. Los datos representan el promedio \pm SD, * $p < 0,05$.

4.6 Expresión de los receptores α y β en el cerebelo

Con el fin de explicar las diferencias obtenidas por tratamiento con E2 en cerebelo con respecto a hipocampo, analizamos la expresión de los receptores α y β en cerebelo e hipocampo por Western blot. Se utilizó la expresión de actina como control de carga. Se observó que los receptores β se encuentran presentes en cerebelo de animales controles, AP y AP tratados con E2. También se determinó que están igualmente representados en el hipocampo.

Por lo contrario, los receptores α están ausentes en todas las muestras de cerebelo, pero están presentes en la muestra de hipocampo (Figura 41).

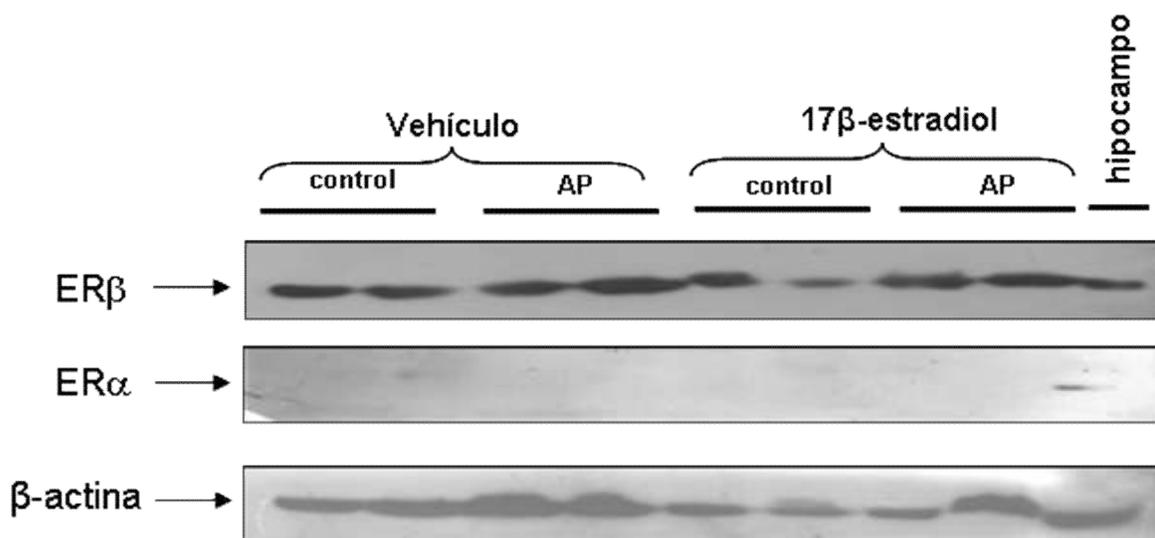


Figura 41: Expresión de los receptores α y β en cerebelo por Western blot.

Se muestra un resultado representativo de un Western blot donde se analiza la expresión de los ER β (panel superior) y ER α (panel del medio). Se utilizó la expresión de actina como control de carga (panel inferior).

DISCUSSION

5. DISCUSIÓN

La Encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) se produce como consecuencia de la privación de oxígeno al cerebro, ya sea por hipoxemia arterial, por isquemia cerebral, o por la concurrencia de ambas situaciones (Ferriero D.M., 2004) y es una constelación de signos neurológicos que aparece inmediatamente después del parto y durante las primeras 24 horas de vida. La EHI desencadena mecanismos bioquímicos que son la causa de los trastornos neuronales a corto y a largo plazo.. Después de un episodio de AP aparece un deterioro del alerta y de la capacidad de despertar, alteraciones en el tono muscular, en las respuestas motoras, en los reflejos y, a veces, convulsiones.

Las regiones del cerebro dañadas por EHI dependen de varios factores, pero los más importantes son el grado y la duración de la hipoxia y la madurez del cerebro en el momento de la agresión. Esto produce un patrón muy característico de gliosis en el putamen posterior, el tálamo ventrolateral, sustancia blanca paracentral e hipocampo. Otra región de vulnerabilidad selectiva es el lóbulo anterior del vermis cerebeloso (Connolly D.J.A. y col., 2007).

En la anoxia generalizada frecuentemente se perjudican en primer lugar las partes más antiguas del cerebro. Por eso, el hipocampo y el cerebelo son comúnmente involucrados por ser filogenéticamente más viejos. La tercera región más afectada es la neo-corteza. Estos patrones de lesiones son generalmente visto en adultos y en niños mayores, pero son menos comunes en los recién nacidos. Por lo tanto, la vulnerabilidad selectiva depende de la edad del paciente, la madurez cerebral, la gravedad y la duración del evento hipóxico.

Posterior a la asfixia, los bebés pueden presentar alteraciones a corto o largo plazo con las consecuentes secuelas neurológicas. Su gravedad depende de la extensión de la lesión, del desequilibrio metabólico durante el período de re-oxigenación y, como se dijo anteriormente, del estado de desarrollo de las regiones afectadas.

La interrupción de suministro de oxígeno causa daño cerebral mediante la falla en la producción de energía, por un incremento en los radicales libres,

citoquinas, excitotoxicidad y produce muerte celular dependiente de caspasas, entre otros (Barks J D. y col.,1992; Martin L J. y col.,1997). El sistema de control de una lesión neuronal implica un balance entre la expresión de numerosas proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas después de la lesión. Este equilibrio proporciona múltiples potenciales enfoques para la modificación de los resultados.

Durante una reducción en la perfusión de leve a moderada, los mecanismos de autorregulación del cerebro se encargan de preservar el flujo sanguíneo a nivel del tallo cerebral, el cerebelo y los ganglios basales. Si la perfusión se reduce y disminuye marcadamente, todo el cerebro se ve afectado, pero las áreas con mayor metabolismo como la corteza cerebelosa, los hipocampos, los núcleos grises profundos y la corteza peri-rolándicas sufren más. Eventualmente, el resto de la corteza y la sustancia blanca también se verán afectadas. Estos dos patrones de lesión se observan generalmente en los adultos, los niños mayores y los bebés maduros. Durante la mielinización aumenta el metabolismo de la sustancia blanca y la actividad de los oligodendrocitos, haciéndolos susceptibles a la isquemia dando como resultando la llamada leucomalacia periventricular.

Diversos estudios sobre HI experimental desarrollado en modelos animales inmaduros demuestran que el daño neuronal posterior se activa inicialmente por la sobreestimulación de los receptores excitatorios de glutamato lo cual produce que se ejecute una cascada sucesiva de eventos. El cerebro neonatal es más excitable eléctricamente y propenso a la excitotoxicidad que el cerebro adulto, y la cascada excitatoria es mayor y se autoperpetua provocando, en última instancia, la lesión neuronal y consecuente degeneración. En este sentido, estudios en animales de laboratorio han demostrado que el cerebro inmaduro responde de manera diferente a los tratamientos con respecto al cerebro maduro así, un tratamiento diseñado para mejorar las lesiones cerebrales en los adultos puede empeorar los resultados en los recién nacidos, posiblemente acentuando la cascada desencadenada de muerte por apoptosis.

En cuando a la comprensión de la fisiopatología de la AP se han obtenido logros significativos, sin embargo, el diagnóstico o valor predictivo de la misma como así también las intervenciones terapéuticas personalizadas para revertir el

proceso de AP están todavía en fase de desarrollo inicial (Gutiérrez-Hernández M A y col., 2011).

En particular pocos estudios fueron realizados para analizar las consecuencias crónicas de la AP sobre el cerebelo.

El presente estudio demuestra que la lesión hipóxica global poco después del nacimiento produce daños a largo plazo en la histología y morfología celular del cerebelo de la rata.

Con el objetivo de analizar las alteraciones cerebelares crónicas tras una AP, se utilizó un modelo de AP en rata, desarrollado por Bjelke (Bjelke, B. y col., 1991) y aplicado y modificado por Capani (Capani, F. y col, 1997; Capani F. y col., 2001). Este modelo es adecuado para el estudio de las fases tempranas y tardías de la AP e imita los aspectos relevantes del nacimiento humano, ya que implica un insulto HI pero sin lesiones adicionales como la oclusión de vasos (Seidl R. y col., 2000). Las alteraciones celulares en el cerebelo fueron analizadas a los 120 días.

El porcentaje de supervivencia de los animales expuestos a los modelos de AP depende del tiempo y de la temperatura en que se induce la hipoxia. A 37° C hay un 100 % de supervivencia hasta los 15 min., 20 % a los 20 min. y 0 % más allá de los 22 min. En este trabajo el modelo de isquemia utilizado fue a 37° C durante 19 minutos, obteniéndose un 80% de supervivencia.

Además, se ha observado que las ratas hembras presentan una supervivencia significativamente mayor que los machos cuando son sometidas a hipoxia en condiciones de normotermia.

Por lo dicho anteriormente, en el presente estudio se utilizaron solamente ratas machos para evitar la influencia benéfica de los estrógenos en las ratas hembras.

La lesión cerebral como consecuencia de la HI no es inmediata, sino que evoluciona durante un periodo de tiempo posterior de producida la lesión inicial.

En cuanto al cerebelo, durante el nacimiento se produce la segunda ola de la proliferación neuronal, la cual desempeña un papel clave en la organización de la corteza cerebelosa, y hace que esta región sea particularmente vulnerable a los insultos en este periodo. El lugar más vulnerable del cerebelo parece ser la capa

granular externa, situada en la superficie del mismo, aunque otros elementos de la corteza cerebelosa pueden verse afectadas. Existen dos mecanismos patogénicos probables operativos que actúan durante este periodo, ya sea que obedezcan a efectos directos sobre el cerebelo, especialmente en la capa granular externa, o por efectos tróficos trans-sinápticos remotos. En cuanto a los efectos directos, se considera a la HI, al ataque de los radicales libres, y a la inflamación como unos de los principales efectores negativos. Es importante destacar que dos o más de los efectores negativos pueden ser sinérgicos o al menos actuar en forma concertada. En cuanto a los efectos trans-sinápticos remotos, parece ser que el crecimiento y el desarrollo del cerebelo pueden estar perjudicados por los déficits en la entrada excitadora del cerebro al cerebelo y también, sobre todo, por la insuficiencia de la salida del cerebelo al cerebro. Este circuito reverberante intacto entre cerebro y el cerebelo y viceversa puede ser especialmente crítico para el crecimiento normal durante esta fase crítica de desarrollo. Una vez más, los efectos trans-sinápticos remotos pueden operar en concierto con los efectos directos en adición o en forma sinérgica. Tanto los efectos directos como los remotos pueden operar después del nacimiento y durante un período prolongado, posiblemente lo suficientemente prolongado para obtener efectos deletéreos que podrían ser interrumpidos a través de intervenciones y prevenciones apropiadas (Volpe J.J., 2009).

Una probable explicación para la alteración del cerebelo podría ser la degeneración trans-sináptica vía el tracto cerebelo-talámico que puede resultar en daño de la sustancia blanca que no es apreciado inmediatamente pero que es evidente posteriormente por la muerte celular programada (Castillo M., 2007).

Aunque los mecanismos adaptativos protegen al cerebro inmaduro del daño hipóxico, los insultos graves pueden desencadenar las alteraciones perjudiciales y duraderas durante días o semanas que resultarán en lesiones importantes (Ferriero D M.,2004). Además se ha observado un diferente grado de daño en la parte superior, intermedia y en la zona inferior de las circunvoluciones del cerebelo. La proliferación microvascular se produce en todo el cerebro (Cervos-Navarro J. y col., 1991; Welsh J P. y col., 2002), como la activación excesiva de la

N-metil-D-aspartato (NMDA receptor) que conduce a un aumento del calcio intracelular y radicales libres, ocasionada por la activación del daño neuronal inducido por hipoxia.

Las CPs en la corteza cerebelosa madura están caracterizadas por uno de los más sofisticados árboles dendríticos que les permite integrar numerosas señales de los circuitos del cerebelo y el tronco cerebral. Las CP se clasifican como neuronas inhibitoras ya que liberan el neurotransmisor GABA (Ácido γ -aminobutírico). Sus principales proyecciones son hacia los núcleos profundos del cerebelo cuya principal función es inhibir o reducir la velocidad de disparo neuronal, particularmente del núcleo dentado (Teune T M. y col, 1998; Uusisaari M. y col, 2008). Adicionalmente las CPs reciben sinapsis excitadoras de varios lugares fuera del cerebelo, por intermedio principalmente de la oliva inferior a través de las fibras trepadoras que, por medio de la protuberancia y el pedúnculo cerebeloso inferior, entran desde el tronco cerebral al cerebelo (McKay B E. y col, 2005). A su vez, el núcleo olivar inferior inerva los núcleos profundos del cerebelo, incluyendo al núcleo dentado, completando de esta manera la red de Purkinje-Olivo-dentado (PODN) (Courville J., 1975).

Es de destacar que hemos observado alteraciones histológicas crónicas en neuronas y células gliales en la corteza cerebelosa de ratas que sufrieron AP. Estas ratas también mostraron una capa de CPs desorganizada, alteraciones en el patrón de localización celular de calbindina y tinción anómala de azul de toluidina. Muchos de estos defectos puede ser el resultado de una interrupción en los sistemas de la migración neuronal radiales existentes en el desarrollo del cerebelo temprano.

La formación de la capa de CP es de hecho un proceso complejo que requiere la interacción de múltiples poblaciones neuronales y patrones migratorios precisos establecidos bajo la guía de la glía. La presencia de CPs en lugares diferentes a su sitio definitivo o sitios heterotópicos puede por lo tanto ser una consecuencia de la migración neuronal defectuosa en el cerebelo en desarrollo.

Una interpretación similar fue propuesta por Laure-Kamionowska y Maślińska en un gran estudio sobre las características morfológicas del cerebelo

en la vida perinatal. Estos autores observaron la presencia de CPs irregularmente dispersas en las capas molecular y granular, con acúmulo de células granulares ectópicas con la apariencia de lesiones displásicas o malformaciones de la corteza cerebelosa. La aglutinación o heterotopía celular en las capas moleculares y granulares se produjo como resultado de una migración alterada de los precursores neuronales en un lugar incorrecto (Laure-Kamionowska M. y col.,2011).

Calbindina es una de las principales proteínas de unión al calcio que actúa como buffer de este catión. y tiene un papel crítico en la prevención de la muerte neuronal, así como el mantenimiento de la homeostasis del calcio. La distribución celular de las proteínas unidas al calcio han sido además útiles como marcadores neuronales para una variedad de sistemas neuronales funcionales y sus circuitos vinculados en la regulación y transporte de varios sistemas enzimáticos de calcio (Heizmann C W y col., 1992).

En nuestro trabajo, las ratas AP mostraron un mayor número de CPs con distribución de la calbindina irregular, que podría ser una consecuencia de una alteración en la morfología de las CPs como resultado de la lesión perinatal, similar a los resultados obtenidos a partir de los experimentos por tinción con azul de toluidina. Sin embargo, algunas CP mostraron una reducción en la expresión de calbindina. La reducción en la expresión proteica de calbindina en animales que sufrieron AP ha sido confirmada por análisis de Western blot. Un resultado similar fue obtenido por Katsetos y col (Katsetos C D y col, 2001) quienes estudiaron la expresión de esta proteína en fetos a término de cobayos. La disminución de calbindina inducida por la hipoxia podría dar lugar a una alteración de la homeostasis del calcio perturbando su señalización, lo que conduciría a una pérdida de sinapsis y disfunciones de la red neural.

En condiciones neurodegenerativas se producen cambios histopatológicos de las dendritas, con degeneración edematosa primaria de las mismas y de los cuerpos neuronales evolucionando rápidamente con algunas neuronas que terminan finalmente en necrosis (Ikonomidou C. y col., 1989).

En nuestro trabajo, estudiamos la morfología de las dendritas de CPs por tinción de la proteína MAP-2. Observamos que las mismas mostraron inflamación focal y marcada fragmentación de la señal de MAP-2, así como un aumento en el porcentaje de MAP-2 en la zona reactiva de animales sometidos a AP. Además, no se observaron ramificaciones o alteraciones en la longitud de las dendritas de CPs, ya que la relación entre las áreas MAP-2 reactivas de la capa externa e interna fue la misma que la obtenida en ratas control. Estas alteraciones dendríticas podrían en parte explicar el aumento observado en el espesor de la capa molecular.

En el estudio llevado a cabo por Matesic DF en conejillos de la india que sufrieron hipoxia determinaron que la lesión predominante de las neuronas piramidales CA1 fue edema y alargamiento dendrítico irregular y persistente, posiblemente causado por una sobrecarga excesiva de Ca^{2+} , y esto se asoció con una pérdida sostenida de MAP-2 (Matesic D F y col., 1994).

Por otro lado, en este trabajo observamos un incremento en el espesor de capa granular interna y una disminución en el número de células granulares por área en ratas AP. Sin embargo, el número total de células granulares en estos animales no se alteró. Esta capa presentó un aumento en el porcentaje de células con núcleos dismórficos (ovales, poligonales) con cromatina teñida irregular, como se visualizó por tinción con azul de toluidina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kohlhauser y col en el mismo modelo murino de AP., los cuales informaron un número notablemente elevado de núcleos con cambios en la cromatina sin pérdida de neuronas en el cerebelo (Kohlhauser C. y col., 1999).

En conjunto, nuestros resultados parecen indicar una migración incompleta de células granulares generadas por la hipoxia y, en consecuencia, una CGI menos compacta.

Además, existe una fuerte relación entre la CGE y las CPs. En el desarrollo cortical normal, señales provenientes de la CGE son cruciales para la localización definitiva de las CPs y distribución en monocapa (Carletti B y col, 2008). Por ello,

las alteraciones observadas en las células granulares podrían además explicar la desorganización en la capa de CPs.

Posteriormente estudiamos los astrocitos en el cerebelo tras una AP ya que los mismos controlan, fundamentalmente, el microambiente celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento. Una característica adicional a tener en cuenta es que los astrocitos conservan la capacidad mitótica y son las que se encargan de la reparación y regeneración de las lesiones del sistema nervioso. Son, igualmente, fundamentales en el desarrollo de las redes neuronales desde las fases embrionarias, pues desempeñan el papel de guía y control de las migraciones neuronales en las primeras fases de desarrollo; asimismo, establecen la regulación bioquímica del crecimiento y desarrollo de los axones y dendritas. Aunque por mucho tiempo se consideró a las células gliales como elementos pasivos en la actividad nerviosa, trabajos recientes demuestran que son participantes activos de la transmisión sináptica, actuando como reguladores de los neurotransmisores (liberando ATP y sus propios neurotransmisores). Además, las células gliales parecen conformar redes paralelas con conexiones sinápticas propias (no neuronales) (Kimmelberg H K. y col, 1989; Gómez N y col, 2008).

Los astrocitos se activan (reactivan) en respuesta a muchas patologías del SNC, tales como apoplejía, trauma, tumores, o enfermedad neurodegenerativa. El proceso de activación de astrocitos resulta en la llamada "gliosis reactiva," una reacción con características estructurales y funcionales específicas.

En este trabajo se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la proteína GFAP que nos permitió visualizar la morfología de los astrocitos y poder determinar si se desencadena o no el proceso de gliosis reactiva en el cerebelo. Por medio de análisis de Western blot, se determinó un aumento en la expresión cerebelar de GFAP en los animales que sufrieron AP, lo cual constituye una característica bien establecida adicional de daño neurodegenerativo del SNC (Eng L F. y col., 1994; Pekny M. y col., 2005).

Por otro lado, el estudio de la morfología astrocitaria mostró un aumento en el área de GFAP positivas en las células Bergmann y en la capa granular en los

animales AP en comparación con los controles, lo cual indica la presencia de astrogliosis y un proceso de neurodegeneración crónica (Eng L F. y col., 1994; Pekny M. y col., 2005).

Cabe señalar que utilizando diferentes modelos de AP, se observa la presencia de déficits motores, posiblemente vinculados a las lesiones del cerebelo, en etapas muy tempranas de la vida que van de días a varias semanas (Young R S y col , 1986), pero que parecen compensarse a los tres meses de edad como lo demostró Hoeger H y col. quienes mostraron que las condiciones neurológicas motoras en animales AP fueron comparables a los de los animales normóxicos. Curiosamente, las ratas con exposición de a 15 y 20 min a hipoxia demostraron una reducción en el comportamiento relacionado con la ansiedad a los 3 meses en las pruebas de laberinto elevado. Entonces se concluye que el retardo de las habilidades motoras complejas es transitorio, pero que los cambios cognitivos son más duraderos. Este hallazgo puede ser relevante para explicar que los trastornos de ansiedad en la edad adulta pueden vincularse con una historia de asfixia en el período perinatal (Hoeger H. y col.,2000).

Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas en los seres humanos por Allin y col. quienes midieron manualmente el volumen de todo el cerebelo por resonancia nuclear magnética de cerebro utilizando un procedimiento de Cavalieri basado en el perímetro del cerebelo en 67 adolescentes nacidos muy prematuros y en 50 controles nacidos a término, y se contrastó con controles neurológicos y pruebas cognitivas que se realizaron al año, cuatro, ocho, catorce y quince años de edad, como parte del seguimiento a largo plazo de los sujetos prematuros. Los sujetos nacidos prematuros habían reducido significativamente el volumen del cerebelo en comparación con los controles nacidos a término. los autores no detectaron asociación entre el volumen del cerebelo y la presencia de signos neurológicos motores. Sin embargo, informaron asociaciones significativas entre el volumen del cerebelo y varios resultados de las pruebas cognitivas, como en la Escala de Inteligencia de Wechsler revisada para niños, la batería de Kaufman para niños y el test de Schonnel para la edad de leer. Esto proporciona más pruebas que involucran al cerebelo en la cognición y sugiere que las

anormalidades del cerebelo pueden subyacer en algunos de los déficits cognitivos que se encuentran en los individuos nacidos muy prematuros (Allin M. y col.,2001).

Entonces, la participación del cerebelo en la cognición y el comportamiento es ahora cada vez más aceptada. Esto no debería ser sorprendente ya que desde un punto de vista anatómico, además de las proyecciones cerebelosas a la corteza sensitivo-motora homóloga, una gran fracción de la conectividad cerebelosa proyecta hacia las regiones cognitivas y afectivas. Los estudios anatómicos recientes demuestran que las conexiones del cerebelo se dirigen a múltiples áreas no motoras de la corteza prefrontal y parietal posterior, así como a áreas motoras corticales. Las proyecciones a diferentes áreas corticales se originan por los diferentes canales de salida de los núcleos del cerebelo. Este circuito de bucle cerrado representa la unidad arquitectónica importante de las interacciones cerebro-cerebelosa. Las salidas de estos bucles otorgan al cerebelo el sustrato anatómico para influir en el control del movimiento y la cognición. Las neuroimágenes y las evaluaciones neuropsicológicas avalan esta hipótesis. La variedad de tareas asociadas o que se ha demostrado que activan al cerebelo es notable e incluye actividades diseñadas para evaluar la atención, el control ejecutivo, el lenguaje, la memoria de trabajo, el aprendizaje, el dolor, la emoción y los hábitos. Estos datos asociados con las evidencias sobre los circuitos cerebro-cerebelosa, proporcionan un nuevo marco para explorar la contribución del cerebelo a diversos aspectos de la conducta (Strick P L. y col., 2009). Además de su papel en el cerebro maduro, el cerebelo actúa en la vida temprana para dar forma a la función de otras regiones del cerebro, especialmente las relacionadas con la cognición y el afecto.

El daño producido durante el periodo neonatal en el cerebelo puede tener consecuencias estructurales y funcionales persistentes en diferentes áreas. Específicamente, los daños secundarios al nacimiento prematuro o como consecuencia de una cirugía produce alteraciones en el comportamiento, actividad o relación social (Bolduc M.E. y col.,2012). Además de las alteraciones en el bucle cerebelo-cerebro se han descrito anormalidades en la información de los mecanismos de alimentación y retroalimentación cerebelo-cerebelo que han sido

asociadas con alteraciones de diversa intensidad en las comunicación sociales como el trastorno del espectro autista (TEA) (Limperopoulos C. y col., 2007).

Estos hallazgos involucran los circuitos del cerebelo anterior implicados en el control motor y los circuitos del cerebelo posterior involucrados en la transformación de la información visual a través de los ajustes motores precisos en TEA (Mosconi M W. y col., 2015).

Además, cuando se producen lesiones o anomalías del desarrollo del cerebelo, algunos pacientes presentan un cortejo sintomático denominado síndrome cognitivo afectivo cerebeloso, secundario a la hipótesis de la dismetría del pensamiento, la cual aparece en la base de algunos trastornos psiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia, en los que se han visto alteraciones en la estructura de este órgano. Las alteraciones descritas son consistentes y están asociadas a patología del vermis posterior.

Sin embargo, no es menos evidente plantear que, cuando se lleva a cabo una lectura crítica de la literatura científica, parece existir una clara división entre aquellos que plantean la participación del cerebelo en funciones cognitivas y emocionales y los que, por otro lado, cuestionan esta afirmación, limitando la participación del cerebelo exclusivamente al componente motor implicado en toda conducta. El estudio del sustrato cerebral de las diferentes funciones cognitivas ha llevado a explorar el cerebro a través de métodos estructurales y funcionales. En este sentido y en una primera fase se intentó encontrar la región fundamental implicada en los diferentes trastornos mentales y del comportamiento, tomando como base técnicas de neuroimágenes estructurales y funcionales como la tomografía axial computada (TAC), resonancia nuclear magnética de cerebro (RNMC), PET y tomografía simple por emisión de fotón único (SPECT), llegando a una conclusión inespecífica, por genérica, responsabilizando a la corteza prefrontal. En una segunda fase, y apoyándose en nuevas técnicas de neuroimagen, como la RMF y la magnetoencefalografía (MEEG), se planteó la posibilidad que el problema no podía confinarse a un área cerebral, y se comenzó a desarrollar una doble idea. Por un lado, se planteó que la clave para comprender los trastornos se encontraba en los circuitos fronto-subcorticales, para concluir que

la mayoría de las alteraciones observadas en la clínica tenían como responsable al circuito fronto-estriado, con la excepción de algunos autores, como Andreasen (Andreasen N C. y col., 1996), que responsabilizó al circuito corticocerebeloso-talamocortical como principal implicado en la esquizofrenia.

Por otro lado, se comenzó a plantear que algunas regiones, sobre todo subcorticales, desempeñaban un importante papel en las funciones cognitivas consideradas hasta entonces de alta complejidad, como la memoria de trabajo o las funciones ejecutivas.

De esta segunda idea parte el planteamiento, tan controvertido, de la existencia del síndrome cognitivo afectivo cerebeloso. En la actualidad, y con la llegada de nuevas técnicas, como el tensor de difusión, se pueden encontrar los responsables de los trastornos para los próximos años como son la sustancia blanca, la glía y las interneuronas (Hernández-Goñi P. y col., 2010).

Según Parvizi (Parvizi J., 2009) sugiere que el punto de vista corticocéntrico del cerebro humano es un punto de vista bastante limitado que no nos permite ver que las funciones mentales superiores del cerebro dependen de la integridad de las estructuras inferiores. Señala que actualmente todavía se conserva, en cuanto a la funcionalidad del cerebro, el punto de vista jerárquico que dominó el siglo XIX, cuando el sistema nervioso se describía como un neuroeje vertical donde las estructuras más rostrales eran las adquiridas más recientemente, telencéfalo y los lóbulos frontales se localizaron en la punta del telencéfalo, lo que representaba la cumbre de la evolución del cerebro. En neurociencia, entonces existe una jerarquía, según esta concepción, las conductas inadecuadas en enfermedades ó patología neurológica y psiquiátrica se explican en términos de desinhibición por falta de control de los lóbulos frontales y liberación de las estructuras inferiores. Esta concepción también ha limitado el estudio de las estructuras subcorticales en la investigación.

Parvizi propuso que no existe una división entre el córtex y estructuras subcorticales (ganglios basales, tálamo, cerebelo, troncoencéfalo), sino una conectividad recíproca, y que la relación no es lineal o vertical de arriba hacia abajo, sino circular, pero que actualmente todavía no se tiene suficiente

conocimiento sobre el modo en que estas estructuras subcorticales, y entre ellas el cerebelo, participan en la regulación y la conducta.

Papel neuroprotector de estradiol en AP

Se han utilizado hasta el momento varios tratamientos con el fin de disminuir las consecuencias de la AP, pero sólo la hipotermia se recomienda como una rutina en la práctica clínica. En los últimos años, la hormona E2 surgió como un potencial agente neuroprotector contra varias enfermedades neurológicas como el síndrome de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y el accidente cerebrovascular.

En un trabajo reciente se ha mostrado la reparación de modificaciones neurodegenerativas crónicas en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley de 4 meses de edad, de sexo masculino, sometidas a AP e inyectadas durante 3 días consecutivos con E2. El tratamiento con E2 revirtió las siguientes alteraciones observadas en los animales AP: astrogliosis clásica, inflamación focal y apariencia fragmentada de las dendritas inmunoreactivas en MAP-2, disminución del área MAP-2 reactiva y de la fosforilación de neurofilamentos de alto y medio de peso molecular. Se demostró entonces que una administración tardía de E2 puede reducir, en animales adultos, las alteraciones neurodegenerativas crónicas inducidas por PA en las primeras etapas de desarrollo. Las propiedades neuroprotectoras del E2 habían sido descritas anteriormente cuando la hormona es administrada antes o poco después de la inducción del daño al cerebro.

Los mecanismos involucrados en las propiedades neuroprotectoras de E2 aún no fueron completamente dilucidados. Dado que las proteínas de los NF son objetivos preferentes para el estrés oxidativo, los estrógenos pueden inducir su función neuroprotectora modulando la producción de radicales libres. Además, muchas evidencias sugieren que los estrógenos están relacionados con la facilitación y la preservación del crecimiento de las dendritas durante el desarrollo del SNC. Por último, los efectos del E2 pueden ser mediados por la activación de ERK, que está implicado en el mantenimiento de la organización del árbol dendrítico y la morfología neuronal en condiciones pro-apoptóticas (Barreto G. y

col., 2015). Si bien, los resultados en hipocampo fueron promisorios, el efecto de la administración de E2 sobre el cerebelo no fue previamente estudiado. Por esta razón evaluamos su efectividad como neuroprotector en las alteraciones H-I en el cerebelo. En este estudio, no se evidenciaron cambios en el espesor de las capas moleculares y granulares internas cerebelares cuando los animales fueron tratados con E2. Por otro lado, el tratamiento con E2 tampoco produjo variación en la distribución y el número de CPs, así como en su morfología dendrítica. Asimismo, no revirtió el número de CPs con tinción anómala de Calbindina.

En el estudio de la morfología de astrocitos por inmunotinción de GFAP en las células Bergmann y en la capa granular no se observó cambio en el porcentaje del área GFAP positiva en los animales tratados con estradiol. Tampoco se detectó un cambio en la expresión de GFAP analizada a través de Western blot.

Es decir, no observamos en cerebelo, alteración de las características morfológicas observadas por tratamiento con estradiol ya sea en animales controles como en los que sufrieron AP.

Sin embargo, cabe la pregunta si el E2 realmente tuvo algún efecto en estos animales. La respuesta es que efectivamente lo hizo ya que se determinó un aumento en la expresión de calbindina tanto en los animales controles como los que sufrieron AP cuando fueron tratados con estradiol. Por otro lado, en el análisis de la relación entre expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y de la proteína proapoptótica Bax (Bcl-2/Bax) se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los animales tratados con E2. Esta relación aumentó a expensas de un incremento en la expresión de Bcl-2 en los animales tratados con estradiol. Esto indica una acción débil antiapoptótica a favor del E2.

Calbindin-D28K (CALB) es una proteína de unión al calcio, se cree que amortigua los niveles de calcio intracelular en las neuronas jugando un papel importante durante el desarrollo del sistema nervioso central tales como, la protección contra la apoptosis (muerte celular programada). El estradiol incrementa la expresión de CALB presumiblemente por la unión de sus receptores de esteroides en el cerebelo. Las hormonas esteroides juegan un importante papel regulador en la expresión CALB en el cerebro (a excepción de la corteza frontal)

donde potencialmente influye en el desarrollo/función de estructuras neuroanatómicas y donde produce cambios neuroprotectores (Stuart E B. y col., 2001).

En cuanto a la modulación de la apoptosis, la capacidad del E2 para modular la expresión de las proteínas Bcl-2 fue demostrada en tejido periférico, no neuronal (células de cáncer de mama humano, en endometrio uterino durante la fase proliferativa del ciclo menstrual (Bhargava V. y col., 1994). En el cerebro, se ha informado un aumento de la regulación de Bcl-2 por el E2 en las neuronas hipotalámicas de ratas hembras *in vivo* (Garcia-Segura L M., y col.1998). También se ha determinado que la administración de E2 evita la disminución en la expresión de Bcl-2 inducida por una lesión cerebral isquémica en la corteza de ratas hembras ovariectomizadas (Dubal D B. y col., 1999). Por otra parte, también ha sido observado que el E2 aumenta significativamente los niveles de Bcl-xL (un miembro de la familia de proteínas de Bcl-2 que actúa aumentando la sobrevivencia), en cultivos de las neuronas de hipocampo (Harms C., y col., 2001).

Probablemente la diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos en el trabajo de hipocampo tenga algunas explicaciones posibles, descartándose como diferencia el modelo de isquemia utilizado, ya que se usó el mismo modelo en los estudios llevados a cabo para el análisis del hipocampo.

Resultados de nuestro laboratorio realizados tanto *in vivo* como en neuronas hipocámpales en cultivo concluyen que el E2 ejerce su efecto neuroprotector en hipocampo a través de su acción sobre el ER α (Barreto G. y col, 2015),

Una posible explicación del efecto diferencial del E2 en el hipocampo y cerebelo podría ser el tipo de ER expresado.

El cerebro es sensible a los esteroides debido a la gran cantidad de RE presentes; sin embargo, las distribuciones de RE α y RE β varían ampliamente en las distintas regiones del cerebro (Shughrue P J. y col., 1997), sugiriendo que cada subtipo de receptor puede jugar un rol diferente en los efectos del estradiol en cada región. En el hipocampo se expresan ambos RE α y β (Han X. y col., 2013).

En cuanto a la expresión de los receptores clásicos de estrógenos en el cerebelo, se ha demostrado que expresa ambos tipos de receptores ($ER\alpha$ y $ER\beta$) en el período neonatal, aunque la expresión del $ER\alpha$ es menor que la del $ER\beta$ (Guo Xing Zhong y col, 2001).

Cuando se estudió la expresión en ratas adultas, no se detectaron ni los transcriptos ni la proteína del $ER\alpha$ (Shughrue P J. y col, 1997; Laflamme N. y col, 1998) como fuera demostrado por estudios de hibridización *in situ* e inmunohistoquímica respectivamente. Indicando que ambos tipos de receptores son expresados en el cerebelo postnatal pero que posteriormente la expresión del $ER\alpha$ disminuye conforme el animal crece, a valores menores a los detectados por los métodos actuales.

Dentro del cerebelo del adulto se ha observado que la expresión del $ER\beta$ es mayor en las PCs y en las células granulares (Handa R J y col., 2012; Ikeda Y. y col., 2006).

Similar a lo previamente observado por esos autores, nosotros determinamos en nuestro sistema la expresión del $ER\beta$, no detectándose la presencia de $ER\alpha$ en cerebelo. Cabe destacar que el $ER\alpha$ fue observado en el hipocampo de estas ratas.

Más allá de los ER clásicos, se sabe que el estradiol puede ejercer su acción a través de receptores de membrana como RE-X y GPR30, En particular el GPR30 se reconoció por primera vez en líneas celulares de cáncer de mama, pero se ha demostrado posteriormente que se expresa en las membranas plasmáticas de las neuronas de los núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo, la pituitaria anterior y posterior, en el hipocampo y en todo el cerebelo pero más abundante en las CPs (Carruth L.L. y col.,2015).

Cabe destacar que el estradiol tiene una gran variedad de efectos en el cerebelo incluyendo la participación en la señalización celular durante el desarrollo y la modulación de la transmisión sináptica en adultos (Hedges V L y col., 2012).

Se han identificado a las CPs como activas células neuroesteroideogénicas en roedores, las cuales producen neuroesteroides inclusive E2 durante el período neonatal cuando ocurre la formación del circuito neuronal cerebelar. El E2 está

involucrado en la formación de dicho circuito a través de la promoción del crecimiento neuronal y contacto sináptico neuronal (Katsunori Sasahara y col, 2007).

A pesar de no haber encontrado diferencias citológicas por el tratamiento con estradiol, y dado que dicho tratamiento produce un aumento de CALB y una tendencia a disminuir la muerte por apoptosis, dos eventos benéficos, es que pensamos que habría que evaluarse la citoarquitectura y la morfología celular a un tiempo más prolongado al utilizado en este trabajo (tres días de tratamiento), a fin de concluir certeramente a cerca del efecto del estradiol sobre la estructura cerebelar.

En conclusión, en este trabajo se muestra los efectos a largo plazo de la AP en la estructura del cerebelo, que podrían estar involucrados en la patogénesis de los déficits cognitivos, como se observa en los animales y los seres humanos.

El E2 no fue un tratamiento efectivo para revertir los cambios producidos por la AP en las ratas probablemente por el tipo de RE expresado en el cerebelo y el tiempo analizado.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En conclusión en este trabajo demotramos que:

A nivel de la capa molecular

- ✓ El espesor de capa molecular era mayor en animales PA en comparación con los controles. El tratamiento con E2 no modificó esta alteración.
- ✓ La densidad celular de las células de la capa molecular se encontró disminuída en en animales AP en comparación con los controles.
- ✓ El número de células totales de la capa molecular se mantuvo constante en los animales PA.

A nivel de la capa granular

- ✓ La capa granular interna (en la convexidad y en los surcos) fue significativamente más gruesa en el grupo de AP en comparación con los controles.
- ✓ Animales AP mostraron una reducción de 27,5% en la densidad celular (granular, Golgi y células gliales) en la capa granular en en comparación con los controles .El tratamiento con E2 no modificó esta alteración.
- ✓ El número de células totales de la capa granular se mantuvo constante en los animales AP.
- ✓ Las células granulares de los animales AP presentaron una mayor cantidad de núcleos dismórficos (ovales, poligonal).

Capa de Células de Purkinje

- ✓ La morfología de la capa de PCs, se encuentra alterada en animales AP en la que en algunas áreas aparecieron como una doble capa y en otras presentan brechas de PCs o acúmulo de las mismas.
- ✓ El número de PCs no se alteró en en el cerebelo de animales AP en comparación con los controles.

- ✓ Los cerebelos de las ratas AP presentan mayor número de PCs con alteraciones en la distribución de calbindina.
- ✓ Las dendritas de las células PCs de los animales sometidos a AP mostraron inflamación focal y fragmentación de MAP-2.
- ✓ Los animales AP presentan un aumento significativo del porcentaje de área reactiva para MAP-2 en todas las subdivisiones de la capa molecular (capa externa, media y externa) en comparación con los controles. El tratamiento con E2 no modifica esta alteración.

A nivel de los astrocitos:

- ✓ Las células Bergmann presentan un aumento del área de GFAP positivas en animales AP.
- ✓ La capa granular presenta un aumento en el área de GFAP positivas en los animales AP en comparación con los controles.
- ✓ La expresión de GFAP por Western blot incrementa en el cerebelo de ratas AP en comparación con los controles.
- ✓ El tratamiento con E2 no modifica la expresión de GFAP.

Apoptosis

- ✓ No hubo diferencia en la relación Bcl-2/Bax por Western Blot entre los animales controles y los AP.
- ✓ El tratamiento con E2 produjo un incremento en la relación Bcl-2/Bax a expensas de un incremento en Bcl-2.

Expresión de los receptores α y β en el cerebelo

- ✓ Los receptores β se encuentran presentes en todas las muestras controles, AP y AP tratado con E2. También se determinó en una muestra de hipocampo donde están igualmente representados.
- ✓ Los receptores α están ausentes en todas las muestras de cerebelo, en cambio están presentes en la muestra de hipocampo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tanto la hipotermia localizada (cerebral) como la sistémica (todo el cuerpo) tienen un efecto neuroprotector en recién nacidos seleccionados tras sufrir EHI. El alopurinol y los opiáceos son los dos únicos fármacos que han demostrado un efecto neuroprotector clínico en la EHI perinatal. Existe evidencia de que la hipotermia en recién nacidos a término tiene efecto neuroprotector cuando se aplica en las primeras 6 horas de vida en centros con experiencia en realizar esta intervención.

Los fármacos antiepilépticos tienen mecanismos de acción múltiple que pueden bloquear la cascada bioquímica de lesión neuronal en EHI. Entre otras modalidades terapéuticas, se encuentra la terapia neuroprotectora combinada, los factores de crecimiento, la terapia genética, el trasplante de células madre y la vacunación neuroprotectora (Legido A. y col, 2007). Si se considera la complejidad de la cascada bioquímica y molecular que caracteriza la fisiopatología de la EHI, es lógico pensar que el uso de un sólo agente terapéutico actuando a un nivel específico no prevenga completamente la lesión neuronal. De ahí la importancia del concepto de terapia combinada, en el que se incluye la administración simultánea de fármacos u otros tratamientos no farmacológicos, la cual tiene múltiples mecanismos de acción.

Lógicamente, para que dichos tratamientos se puedan utilizar en la práctica clínica, se requiere la demostración, en estudios de investigación clínica, de que cada fármaco por separado tiene acción neuroprotectora y que la combinación de varios de ellos potencia dicho efecto, por ello consideramos que habría que analizar los efectos del E2 administrado durante un período prolongado mayor y a tiempos mas largos para poder concluir fehacientemente si el mismo es un candidato para ser utilizado en la terapia de pacientes que sufrieron EHI.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA

A

Alekseeva N., Kablinger A. S., Pinkston J., Gonzalez-Toledo E. C. and Minagar A., 2005. Hereditary ataxia and behavior. *Advances in neurology* 96, 275-283.

Allen G., Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. 1997. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science*; 275:1940-1943.

Allen, S.J., Dawbarn, D., 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci* 110 (2): 175–91.

Allin, M., et al., 2001. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain* 124, 60–66.

Andreasen NC, O'leary DS, Arndt S, Cizadlo T, Hurtig R, Rezai K, y col 1995. Short term and long term verbal memory: A positron emission tomography study. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 5.111-5.115.

B

Balduini, W., Carloni, S., Mazzoni, E., Cimino, M., 2004. New therapeutic strategies in perinatal stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3.315-23.

Barinaga M., 1996. The Cerebellum: Movement coordinator or much more? *Science*; 272: 482-483.

Barks, J.D., Silverstein, F.S., 1992. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol.* 2:235-43.

Barreto George, Ezequiel Saraceno, Janneth Gonzalez, Rodolfo Kolliker, Roció Castilla, and Francisco Capani, 2015. Neuroprotection with Estradiol in Experimental Perinatal Asphyxia: A New Approach in Estrogen Effects on Traumatic Brain Injury edited by Kelli A. Duncan, Elsevier , pp 113-125.

Basado en Brain Res 1973 .(R. L. Sidman and P. Rakic, "Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review," *Brain Research*, vol. 62, no. 1, pp. 1–35.).

Beato, M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56:335–344.

Beato M, Candau R., Chavez S., Mows C., Truss M. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involves chromatin remodelling. *J Steroid Biochem Mol Biol.*;56(1-6 Spec No):47-59.

Behl, C., Skutella, T., Lezoualch, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., Holsboer, F., 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol.* 51:535-541.

Benito, M., Valverde, A.M., Lorenzo, M., 1996. IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:499–510.

Berquin, P.C., et al., 1998. Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. *Neurology* 50, 1087–1093.

Bhargava V, Kell D.L, van de Rijn M., Warnke R.A.,1994. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol.*;145(3):535-40.

Biran V. , Vivi M. Heine f, Catherine Verney , R. Ann Sheldon a, Ruggero Spadafora , Zinaida S. Vexler , David H. Rowitch , Donna M. Ferriero 2011. Cerebellar abnormalities following hypoxia alone compared to hypoxic–ischemic forebrain injury in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease* 41:138–146.

Bolduc M.E., du Plessis A.J., Sullivan N., Guizard N., Zhang X., Robertson R.L., Limperopoulos C. 2012. Regional cerebellar volumes predict functional outcome in children with cerebellar malformations. *Cerebellum*;11:531-542.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bruce-Keller, A.J., Keeling, J.L., Keller, J.N., Huang, F.F., Camondola, S., Mattson, M.P., 2000. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*. 141(10):3646-3656.

C

Carletti B. , Williams MI , Leto K , Kazunori Nakajima K, Magrassi L, Rossi F. 2008. Time constraints and positional cues in the developing cerebellum regulate Purkinje cell placement in the cortical . *Developmental Biology*; 317:147–160.

Capani, F., Loidl, F., Lopez-Costa, J.J., Selvin-Testa, A., Saavedra, J.P.,1997.Ultrastructural changes in nitric oxide synthase immunoreactivity in the

brain of rats subjected to perinatal asphyxia: neuroprotective effects of cold treatment; *Brain Res.*, 775(1-2):11-23.

Capani, F., Loidl, C.F., Aguirre, F., Piehl, L., Facorro, G., Hager, A., De Paoli, T., Farach, H., Pecci-Saavedra, J., 2001a. Changes in reactive oxygen species (ROS) production in rat brain during global perinatal asphyxia: an ESR study. *Brain Res.* 914, 204–207.

Capani, F., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., 2001b. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. *J Comp Neurol* 435:156-170.

Capani, F., Loidl, C.F., Piehl, L.L., Facorro, G., De Paoli, T., Hager, A., 2003. Long term production of reactive oxygen species during perinatal asphyxia in the rat central nervous system: effects of hypothermia; *Int J Neurosci.*, 113(5):641-54.

Capani, F., Saraceno, G.E., Botti, V., Aon-Bertolino, L., de Oliveira, D.M., Barreto, G., Galeano, P., Giraldez-Alvarez, L.D., Coirini, H., 2009. Protein ubiquitination in postsynaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia. *Exp Neurol.* 219, 404–413.

Cardona-Gómez GP, Chowen JA, Garcia-Segura LM. 2000. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol.* 43:269-281.

Cardona-Gomez, G.P., Mendez, P., Garcia-Segura, L.M., 2002a. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res.* 107:80–88.

Cardona-Gomez, G.P., Mendez, P., Don Carlos, L.L., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2002b. Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83:211–217.

Carrera, J.M., 2010. Libro: Protocolos de obstetricia y medicina perinatal 4° ed. Editorial Elsevier-Masson.

Carruth L.L. and Mahin Shahbazi M.,2015. Estrogen Actions in the Brain, in Experimental Perinatal Asphyxia: A New Approach in Estrogen Effects on Traumatic Brain Injury edited by Kelli A. Duncan, Elsevier, pp 11-28.

Castillo M., 2007. Commentary. *AJNR* 28: 20-21.

Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M.V., Auricchio, F., 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the Sphase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 20(21):6050-6059.

Cebral, E., Capani, F., Selvín-Testa, A., Funes, MR., Coirini, H., Loidl, C.F.,2006. Neostriatal cytoskeleton changes following perinatal asphyxia: effect of hypothermia treatment; *Int J Neurosci.*, 116(6): 697-714.

Cérvos-Navarro, J., Henrick, N., 1991. Selectively vulnerability in brain hypoxia. *Neurobiology.* 6,3:149-182.

Courville J..1975. Distribution of olivocerebellar fibers demonstrated by a radioautoradiographic tracing method. *Brain Res* ; 95: 253-263.

Chang C.H., F. M. Chang, C. H. Yu, H. C. Ko, and Chen H. Y. 2000. "Assessment of fetal cerebellar volume using threedimensional ultrasound," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 26, no. 6, pp. 981–988.

Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7: 369-379.

Choi D. W., Rothman S. M., 1990. *The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death*; Annual Review of Neuroscience., Vol. 13, Pages 171-182.

Choi, D.W., 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.

Cohen, P., Frame, S., 2001. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2, 769– 776.

Connolly DJA, Widjaja E, Griffiths PD, 2007. Involvement of the anterior lobe of the cerebellar vermis in perinatal profound hypoxia. *AJNRAmJ Neuroradiol*; 28:16–19.

Cummins E. P, Taylor C.T., 2005. Hypoxia-responsive Transcription factors. *Plügers Archiv-European Journal of Physiology*. Voume 450, Issue 6, September.

D

Delivoria-Papadopoulos, M., Mishra, O.P., 2000. Mechanisms of perinatal cerebral injury in fetus and newborn. *Ann N Y Acad Sci.* 900:159-68.

Dhandapani, K.M., Brann, D.W., 2007. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol.* 42(1-2):70-75.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M., 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J. Neurosci.* 19, 6385–6393.

Du C., Hu, R., Csernansky, C.A., Hsu, C.Y., Choy, D.W., 1996. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:195-201.

du Plessis AJ, Volpe JJ. 2002 Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol*;15:151-157.

E

Eng LF, Ghirnikar RS.,1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* ;4:229-237.

Exner C, Weniger G, Irle E.2004. Cerebellar lesions in the PICA but not SCA territory impair cognition. *Neurology.* 63(11):2132-5.

F

Ferriero DM. , 2004. Neonatal Brain Injury. Review. *N Engl JMed.* Nov 4;351(19):1985-95.

Fine EJ, Ionita CC, Lohr L (2002). «The history of the development of the cerebellar examination». *Semin Neurol* 22 (4): 375–84.

Friede RL 1989. *Developmental Neuropathology*. 2nd ed. Springer Verlag, Berlin; p. 363.

G

Galeano, P., Blanco Calvo, E., Madureira de Oliveira, D., Cuenya, L., Kamenetzky, G.V., Mustaca, A.E., Barreto, G.E., Giraldez-Alvarez, L.D., Milei, J., Capani, F., 2011. Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *Int J Dev Neurosci*. 29(6):609-19.

Garcia-Estrada, J., Del Rio, J.A., Luquin, S., Soriano, E., Garcia-Segura, L.M., 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res*. 19;628(1-2):271-8.

Gillig M.P., and Sanders R.D, 2010,..Psychiatry, Neurology, and the role of the cerebellum. *Psychiatry* (Edgemont);7(9):38–43.

Ginsberg, M., 1995. Neuroprotection in brain ischemia: an update (part I). *The neuroscience*, Vol 1, 2: 95-103.

Gómez N, Nieto Sampedro D y M. 2008. "Glía reactiva", *Mente y Cerebro*, 32, págs. 78-87.

González, F.F., Ferriero, D.M., 2008. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther*. 120, 43–53.

Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10(4):1286-91.

Goyen, T.A., et al., 1998. Visual-motor, visual-perceptual, and fine motor outcomes in very-low-birthweight children at 5 years. *Dev. Med. Child Neurol.* 40, 76–81.

Guo Xing Zhong, Jun Da SU, Qing Wen Sun, Bing Hua Jiao, 2001. Expression of estrogen receptor (ER) - and - transcripts in the neonatal and adult rat cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulb. *Cell Research*; 11(4): 321-324.

H

Hall, A.C., Lucas, F.R., Salinas, P.C., 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525–535.

Hedges VL, Ebner TJ, Meisel RL, Mermelstein PG. 2012. The cerebellum as a target for estrogen action. *Front Neuroendocrinol.*, Oct , 33(4):403-11.

Hempstead, B.L., 2006. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361 (1473): 1545–64.

Herbert M. R. C., V.S. 2006 *Neuroanatomy and imaging studies*, London: Mac Keith Press.

Hurtado de Mendoza, T., Pérez-García, CG, Kroll, TT, Hoong, NH, O'Leary, DD, and Verma, IM. 2011. Antiapoptotic protein life-guard is required for survival and

maintenance of purkinje and granular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17189 - 17194.

I

Ito M. 1984. *The cerebellum and neural control*. New York: Raven.

J

Johnston, M.V., Trescher, W.H., Ishida, A., Nakajima, W., 2000. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol* 5:75–86.

Johnston, M.V., 2001. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 7:229-34.

K

Katsetos CD, Spandou E, Legido A, Taylor ML, Zanelli SA, de Chadarevian JP, Christakos S, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos A. 2001. Acute hypoxia-induced alterations of calbindin-D28k immunoreactivity in cerebellar Purkinje cells of the guinea pig fetus at term. *J Neuropathol Exp Neurol.* ;60(5):470-82.

Katsunori Sasahara, Hanako Shikimi, Shogo Haraguchi, Hirotaka Sakamoto, Shin-ichiro Honda, Nobuhiro Harada, and Kazuyoshi Tsutsu, 2007. Mode of Action and Functional Significance of Estrogen-Inducing Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis in the Developing Purkinje Cell. *The Journal of Neuroscience*, July 11, 27(28):7408 –7417.

Keshamouni, V.G., Mattingly, R.R., Reddy, K.B., 2002. Mechanism of 17- β -estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC δ . *J Biol Chem.* 277:22558–22565.

Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM., 2008. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev* ;32:1519-1532.

Kirino, T., Tamura, A., Sano, K., 1984. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 64:139-47.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.Å., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci.* 93:5925–5930.

L

Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Revest S., 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERa and ERb) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* ; 36:357-78.

Laure-Kamionowska M, Maslinska D. 2011. Cerebellar cortical neurons misplaced in the white matter due to disturbed migration during development of human brain. *Folia Neuropathol* ;49:282-294.

Lawn JE, Cousens S, Zupan J., 2005. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* ;365:891-900.

Legido A., Valencia I., Katsetos CD., María Delivoria-Papadopoulos M. 2007. Neuroprotección en la encefalopatía hipóxico isquémica perinatal. Tratamientos

con eficacia clínica demostrada y perspectivas futuras. *Medicina (B. Aires)* v.67 n.6-1 supl.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res.* 239:183-201.

Levisohn, L., et al., 2000. Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain* 123 (Pt 5), 1041–1050.

Limperopoulos, C., et al., 2007. Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics* 120, 584–593.

Loeser J.D., Lemire R.J., and E. C. Alvord E. C., 1972. “The development of the folia in the human cerebellar vermis,” *Anatomical Record*, vol. 173, no. 1, pp. 109–113.

Loidl C F, De Vente J, van Ittersum MM, van Dijk EH, Vles JS, Steinbusch HW, and Blanco CE. 1998. Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum. *Brain Res.*;791(1-2):303-7.

Loidl CF, Herrera-Marschitz M, Andersson K, You ZB, Goigny M, O'Connor WT, Silveira R, Rawal R, Bjelke B, Chen Y, et al., 1994. Long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia neurotransmitter systems studied with microdialysis in rat; *Neurosci Lett.*, 4;175(1-2):9-12.

Lorenzo, A., Díaz, H., Carrer, H., Cáceres, A., 1992. Amygdala neurons in vitro: neurite growth and effects of estradiol. *J Neurosci Res.* 33(3):418-435.

Loven, M.A., Wood, J.R., Nardulli, A.M., 2001a. Interaction of estrogen receptors a and b with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol* 181:151–163.

Loven, M.A., Likhite, V.S., Choi, I., Nardulli, A.M., 2001b. Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor b conformation. *J Biol Chem.* 276:45282–45288.

M

Maggi, A., Ciana, P., Belcredito, S., Vegeto, E., 2004. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol.* 66:291-313.

Markesbery, W.R., Lovell, M.A., 2007. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 64, 954-6.

Matesic DF, Lin RC. 1994. Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem*;63:1012-1020.

Martin, R.L., Lloyd, H.G., Cowan, A.I., 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17:251-7.

Martin, L.J., Brambrink, A., Koehler, R.C., Traystman, R.J., 1997. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J Comp Neurol.* 377:262-85.

Martin, S.S., Perez-Polo, J.R., Noppens, K.M., Grafe, M.R., 2005. Biphasic changes in the levels of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and caspase 3 in the immature brain following hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci* 23, 673-86.

McEwen, B., 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 57:357–384.

McEwen BS., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* ;87:873-904.

McKay BE, Turner RW.2005. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol* ; 567: 829-850.

Mendez, P., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Mol. Brain Res.* 112, 170–176.

Messerschmidt, A., et al., 2008. Disrupted cerebellar development in preterm infants is associated with impaired neurodevelopmental outcome. *Eur. J. Pediatr.* 167,1141–1147.

Miller SP, Ferriero DM., 2009. From selective vulnerability to connectivity: insights from newborn brain imaging. *Trends Neurosci* ;32:496-505.

Molinari M, Leggio MG, Solida A, Ciorra R, Misciagna S, Silveri MC, et al., 1997. Cerebellum and procedural learning: Evidence from focal cerebellar lesions. *Brain* ; 120: 1.753-1.762.

Molinari M., Petrosini I., Misciagna S., Leggio MG., 2004. Visuospatial abilities in cerebellar disorders *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;75:235–240.

Moosmann, B., Behl, C., 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 8867-8872.

Moss, R.L, Gu, Q., 1999. Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons, *Steroids.* 64:14–21.

Mosconi MW, Mohanty S, Greene RK, Cook EH, Vaillancourt DE, Sweeney JA.2015. Feedforward and feedback motor control abnormalities implicate cerebellar dysfunctions in autism spectrum disorder. *JNEUROSCI.*4;35(5):2015-25.

N

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. 2001. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis.* 2:207-19.

Northington, F.J., 2006. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J.*47(1):32-8.

O

Odd DE, Lewis G, Whitelaw A, Gunnell D. 2009. Resuscitation at birth and cognition at 8 years of age: a cohort study. *Lancet*;373:1615-1622.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U., 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* 18:1859–1875.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P., 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:552-65.

Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J., 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 23, 91–147.

P

Pascual-Leone A, Grafman J, Clark K, Stewart M, Massaquoi S, Lou JS, et al., 1993 Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. *Ann Neurol* ; 34: 594-602.

Parvizi J. 2009. Corticocentric myopia: old bias in new cognitive sciences. *Trends Cogn Sci* ; 13: 354-9.

Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* ;50:427-434.

Petito CK, Pulsinelli WA. 1984. Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia; *J Neuropathol Exp Neurol.*, 43(2):141-53.

Pike, C.J., 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 72(4):1552-1563.

Powls, A., et al., 1995. Motor impairment in children 12 to 13 years old with a birthweight of less than 1250 g. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal* Ed. 73, F62–F66.

Q

Qiagen website 2011. Annual Report on its website at
http://www.qiagen.com/about/investorrelation/aboupdf/qia_ar11_web.pdf

R

Raap, D.K., DonCarlos, L., Garcia, F., Muma, N.A., Wolf, W.A., Battaglia, G., van de Kar, L.D., 2000. Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology*. 39:1823–1832.

Rakic, P., Sidman, R.L., 1970. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol*. 139, 473-500.

Rau, S.W., Dubal, D.B., Böttner, M., Gerhold, L.M., Wise, P.M., 2003. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci*. 23(36):11420-11426.

Reichardt L.F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1473):1545-64.

Romero J.R., 2007. Prevention of ischemic stroke: overview of traditional risk factors. *Curr Drug Targets*, 794-801.

S

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. *Exp Neurol* 223:615-622.

Saraceno G., Ayala, M., Badorrey, M., Holubiec, M., Romero, J., Galeano, P., Barreto, G., Giraldez-Alvárez, L., Kölliker-Fres, R., Coirini, H., Capani, F., 2011. Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton. *Synapse*. Aug 19. doi: 10.1002/syn.20978. (Epub ahead of print).

Saraceno G. E..Tesis de Doctorado,2012. Dinámica de los cambios tridimensionales del citoesqueleto sináptico inducidos por hipoxia-isquemia. Buenos Aires.

Sawada, M., Alkayed, N.J., Goto, S., Crain, B.J., Traystman, R.J., Shaivitz, A., Nelson, R.J., Hurn, P.D., 2000. Estrogen receptor antagonist ICI182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*. 20(1):112-118.

Seidl R, Stockler-Ipsiroglu S, Rolinski B, Kohlhauser C, Herkner KR, Lubec B, Lubec G.2000. Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life Sci*;67:421-435.

Schulman JA and F. E. Bloom 1981, Golgi cells of the cerebellum are inhibited by inferior olive activity, *Brain Research*, 210,: 350–355.

Shoulson, I., 1992. Neuroprotective clinical strategies for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 32(Suppl):S143–S145.

Shughrue PJ, Lane MV, and Merchenthaler I.,1997. Comparative distribution of estrogen receptor - and - mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*; 388: 507-25.

Singer, C.A., Figueroa-Masot, X.A., Batchelor, R.H., Dorsa, D.M., 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci.* 19:2455–2463.

Sidman R. L. and P. Rakic 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research*, vol. 62, no. 1, pp. 1–35.

Silver, I.A., Deas, J., Erecinsk, M., 1997. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience.* 78:589-601.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., Liao, J.K., 2000. Interaction of estrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 407(6803):538-541.

Smith, C.L., O'Malley, B.W., 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* 25:45–71.

Song, R.X., McPherson, R.A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., Santen, R.J., 2002. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 16:116–127.

Sotelo C. 2004. "Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system," *Progress in Neurobiology*, 72,(5):295–339.

Strick PL, Dum RP, Fiez JA.2009. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci* ;32:413-434.

Stuart EB; Thompson JM, Rhees RW, Lephart ED.2001. Steroid hormone influence on brain calbindin-D_{28K} in male prepubertal and ovariectomized rats. *Developmental Brain Research* ; Volume 129, Issue 2, Pages 125–133.

Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G.W., Saito, A., Hayashi, T., Narasimhan, P., Maier, C.M., Chan, P.H., 2004. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 1, 17-25.

T

Teune TM, van der Burg J, de Zeeuw CI, Voogd J, Ruigrok TJ.1998. Single Purkinje cell can innervate multiple classes of projection neurons in the cerebellar nuclei of the rat: a light microscopic and ultrastructural triple-tracer study in the rat. *J Comp Neurol* ; 392: 164-178.

Thomas, N., George, K.C., Sridhar, S., Kumar, M., Kuruvilla, K.A., Jana, A.K., 2011. Whole body cooling in newborn infants with perinatal asphyxial encephalopathy in a low resource setting: a feasibility trial. *Indian Pediatr.* 7;48(6):445-51.

Tirapu-Ustárroz Javier, Pilar Luna-Lario, M. Dolores Iglesias-Fernández, Pilar Hernández-Goñi, 2011. Contribución del cerebelo a los procesos cognitivos: avances actuales *Rev Neurol* ; 53 (5): 301-315.

Toran-Allerand, C.D., 1996. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev Neurosci.* 18(1-2):36-48.

Toran-Allerand, C.D., Singh, M., Sétáló, G., 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front. Neuroendocrinol.* 20:97–121.

Tripanichkul, W., Sripanichkulchai, K., Duce, J.A., Finkelstein, D.I., 2007. 17Beta-estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Res.* 1164:24-31.

Turgeon, J.L., McDonnell, D.P., Martin, K.A., Wise, P.M., 2004. Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science.* 304(5675):1269-1273.

U

Uusisaari M, Knöpfel T.2008. GABAergic synaptic communication in the GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* ; 156: 537-549.

V

Vannucci RC, 1990. Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic. Ischemic encephalopathy. *Pediatrics* ;85(6):961-8.

Volpe, J.J., 2009. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J. Child Neurol.* 24, 1085–1104.

W

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, .A, Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., Chambon, P., 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci.* 82:7889–7893.

Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA. 2002. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* ;89:331-359.

Wingate R. J. T., 2001. "The rhombic lip and early cerebellar development," *Current Opinion in Neurobiology*, 11 (1):, 82–88.

Y

Young RS, Kolonich J, Woods CL, Yagel SK., 1986. Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*;17:1313-1316.

Yune, T.Y., Park, H.G., Lee, J.Y., Oh, T.H., 2008. Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent CREB activation. *J Neurotrauma.* 25(9):1121-1131.

Z

Zhu, C., Wang, X., Huang, Z., Qiu, L., Xu, F., Vahsen, N., Nilsson, M., Eriksson, P.S., Hagberg, H., Culmsee, C., Plesnila, N., Kroemer, G., Blomgren, K., 2007. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 14:775-84.

Zhu, T.S., Glaser, M., 2008. Neuroprotection and enhancement of remyelination by estradiol and dexamethasone in cocultures of rat DRG neurons and Schwann cells. *Brain Res.* 1206:20-32.