

REVISTA DE NEUROLOGÍA

Revisión en Neurociencia

**HIPOXIA-ISQUEMIA NEONATAL:
BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL DAÑO CEREBRAL Y MODULACIÓN
TERAPÉUTICA DE LA NEUROGÉNESIS**

Yasmina Moral Sánchez¹, Nicola J Robertson², Felipe Goñi-de-Cerio³ y Daniel Alonso-Alconada¹

¹Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, España.

²Institute for Women's Health, University College London, London, UK.

³GAIKER Centro Tecnológico. Parque Tecnológico, ed. 202. Zamudio, Bizkaia, España.

Correspondencia: Prof. Daniel Alonso-Alconada. Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n, 48940, Leioa, Bizkaia, España.

Fax: +34 94 601 3266.

Email: daniel.alonsoa@ehu.eus

Agradecimientos / fuentes de financiación: Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda otorgada por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea dentro del programa de Ayudas a Grupos de Investigación de la UPV/EHU (GIU 17/018).

Conflictos de interés: Todos los autores están conformes con los contenidos del manuscrito y no existe ningún conflicto de interés.

RESUMEN

Introducción. La asfixia perinatal continúa siendo una de las mayores causas de morbi-mortalidad neurológica. La encefalopatía neonatal derivada constituye una causa importante de daño cerebral afectando de manera moderada-grave a 1-3/1000 recién nacidos y comportando un alto riesgo de déficits neurológicos permanentes. La única aproximación terapéutica actual consiste en la hipotermia terapéutica, cuya eficacia, aunque constatada, es moderada, ya que no siempre consigue una recuperación funcional total.

Desarrollo. Se desconoce con certeza si la hipotermia tiene la capacidad de promover la proliferación celular en los nichos neurogénicos cerebrales, donde permanecen células madre neuronales con capacidad de proliferación y diferenciación. El empleo de agentes terapéuticos como la eritropoyetina o los cannabinoides y de células madres mesenquimales ha mostrado resultados prometedores en diversos modelos experimentales de asfixia perinatal, siendo capaces de modular los procesos de neurogénesis, de plasticidad neuronal y de neuro-reparación tras daño cerebral hipóxico-isquémico.

Conclusiones. Aún se desconocen los efectos de estas terapias en modelos clínicos, y si las células recién formadas serán capaces de integrarse de forma efectiva en las redes neuronales existentes o si podrán desarrollar sus funciones adecuadamente en un microambiente de lesión cerebral, haciéndose necesario el desarrollo de nuevos trabajos enfocados a evaluar el potencial real de estos agentes en la modulación terapéutica de la neurogénesis tras hipoxia-isquemia neonatal.

Palabras clave: Asfixia perinatal. Daño cerebral. Fisiopatología. Hipoxia-Isquemia. Neonato. Neurogénesis.

Palabras de cabecera: Neurogénesis tras hipoxia-isquemia neonatal

1. INTRODUCCIÓN

La asfixia perinatal continúa siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad neurológica en el recién nacido. Dicha situación clínica implica la existencia de un trastorno en el intercambio de gases, cuyo resultado es el déficit de oxígeno (O₂) y el exceso de dióxido de carbono (CO₂), con la consiguiente acidosis derivada. El mantenimiento de la asfixia casi siempre producirá hipotensión e isquemia [1,2].

En la práctica clínica ha quedado acuñado el término hipoxia-isquemia dada la dificultad para establecer con precisión si ha predominado la hipoxemia (disminución de la cantidad de O₂ en sangre) o la isquemia (disminución de la perfusión de sangre), como determinante etiopatogénico principal [2]. Seguramente, en la mayoría de los casos, una combinación de ambas condiciona la deficiencia de O₂ en los tejidos, determinante de la lesión neurológica causada por la agresión hipóxico-isquémica.

Cuando el episodio de hipoxia-isquemia asociado a la asfixia es suficientemente grave para dañar el cerebro del recién nacido, éste presenta en las primeras horas de vida un síndrome neurológico denominado encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). El término “encefalopatía” define la manifestación clínica del anormal funcionamiento de la función cerebral tras el daño, que se caracteriza por dificultad para despertar o mantener la vigilia, dificultad para iniciar o mantener la respiración (depresión respiratoria), alteración del tono muscular y de las respuestas motoras, de la reactividad y los reflejos, de la capacidad de alimentación y, con frecuencia, convulsiones [3].

La EHI constituye una causa importante de daño cerebral comportando un alto riesgo de déficits neurológicos permanentes en los recién nacidos a término o casi a término (≥ 36 semanas de gestación) [4]. Este síndrome neurológico supone un problema socio-sanitario relevante, afectando a 1-3 de cada 1.000 recién nacidos, relación que aumenta hasta el 60% en los pretérmino [5,6]. En países en vías de desarrollo, donde se hace difícil el manejo de estos niños de alto riesgo, estos valores se ven incrementados hasta los 10-20 de cada 1.000 recién nacidos [7]. En España, mediante un estudio transversal realizado en 90 hospitales, la incidencia de EHI moderada-grave fue 0,77/1.000 recién nacidos vivos [8].

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión actualizada de la fisiopatología desencadenada tras la asfixia perinatal y de la posible modulación de la neurogénesis y de los procesos de plasticidad neuronal y de neuroreparación tras el daño cerebral hipóxico-isquémico (HI) neonatal.

2. FASES DEL DAÑO HIPÓXICO-ISQUÉMICO

El daño HI desencadena una serie de cascadas metabólicas complejas que se desarrollan en varias fases, comenzando inmediatamente tras el daño asfíctico y pudiéndose extender hasta meses después. En cada una de estas etapas intervienen procesos moleculares concomitantes (resumidos en la Fig. 1) y supone la implicación de numerosos tipos celulares, desde neuronas hasta células inmunitarias, así como células gliales y endoteliales [9,10].

2.1. Fase aguda

En los primeros minutos tras el daño, el descenso en la perfusión de oxígeno y de los niveles de glucosa provoca la depleción de compuestos de alta energía, principalmente adenosín trifosfato (ATP) y fosfocreatina, necesarios para mantener el metabolismo intracelular. Este proceso desencadena un fracaso energético que conlleva despolarización neuronal y fallo en las bombas de sodio (Na^+) y potasio (K^+), dependientes de ATP [10,11]. Debido al fracaso en su recaptación, los niveles de aminoácidos excitatorios aumentan en la hendidura sináptica, lo que en un estadio posterior desembocará en excitotoxicidad [12-14]. Durante esta situación aguda, y debido en parte a la acumulación intracelular de iones de Na^+ y Cl^- con el consiguiente arrastre de H_2O , se puede producir la muerte de la neurona por necrosis. La magnitud de la pérdida neuronal dependerá de factores diversos, tales como la severidad y la duración del daño HI o la región cerebral afectada, entre otros [11].

2.2. Fase latente

Tras la fase aguda del daño HI tiene lugar la reperusión celular y tisular, durante la cual el metabolismo energético parece recuperarse; sin embargo, esta recuperación es tan solo transitoria [15]. En este lapso temporal, denominado “fase latente”, se ha observado una disminución de la actividad electroencefalográfica y una reducción del consumo de O_2 , aunque mediante espectroscopia de resonancia magnética se aprecian niveles normales de metabolitos celulares [4,16]. Mediante esta técnica, se ha podido establecer que la duración de esta fase está inversamente relacionada con la gravedad del daño. Así, un insulto HI severo se asocia a un periodo latente más corto y a mayor muerte neuronal [11,17]. La duración de esta fase no ha sido establecida con claridad: diversos estudios hablan de un periodo que puede abarcar desde la primera hora hasta las 6-24h. Este lapso temporal presenta gran utilidad en la práctica clínica, denominándose ventana terapéutica, en el que actuar mediante el empleo de estrategias terapéuticas para aminorar el daño cerebral [11].

2.3. Fase secundaria

La recuperación parcial que tiene lugar durante la fase latente es seguida por un deterioro secundario. A pesar de la hiperperfusión previa, en la que los niveles de O₂ parecen encontrarse normales y la circulación se restablece, se produce un aumento de los niveles de lactato cerebral y el pH se alcaliniza [11]. Una de las consecuencias clave producidas durante esta fase es el deterioro de la función mitocondrial. Las mitocondrias, además de ser las principales responsables de la producción de ATP, juegan un papel importante en procesos celulares como la autofagia y en la regulación de la muerte celular mediante apoptosis o muerte celular programada. Así, el daño mitocondrial puede producir el desacoplamiento del metabolismo oxidativo, desencadenando edema citotóxico, hiperperfusión cerebral y muerte celular [15,17]. La magnitud del fracaso energético durante esta fase se relaciona estrechamente con la gravedad de la discapacidad neurológica ulterior y la alteración del crecimiento del neonato [4,18-20].

2.4. Fase terciaria

De reciente descripción [9], aparece una fase terciaria de daño considerada responsable de los daños permanentes que llegarán hasta la edad adulta. La duración de la misma puede extenderse meses o incluso años tras el daño HI y predispone al paciente a padecer peores resultados a largo plazo. La persistencia de alcalosis cerebral láctica en niños tras un año de vida y de mecanismos lesivos como gliosis o la activación de receptores inflamatorios y cambios epigenéticos aparecen relacionados con problemas del neurodesarrollo [9,11].

3. FISIOPATOLOGÍA

El cerebro de los neonatos presenta una serie de características que lo hacen especialmente susceptible a la agresión hipóxica-isquémica, tales como un mayor consumo de oxígeno, mayor contenido de agua, baja concentración de enzimas antioxidantes o una menor mielinización [21,22]. La fisiopatología de la EHI es multifactorial (Fig. 1), siendo ésta una de las principales causas de la falta de un tratamiento efectivo para reducir las lesiones cerebrales neonatales y obligando a establecer diferentes dianas terapéuticas para tratar de frenar o aminorar sus devastadoras consecuencias [23].

3.1. Excitotoxicidad

La asfixia perinatal favorece la acumulación de neurotransmisores excitatorios, principalmente glutamato y aspartato, los cuales producen la activación continuada de diferentes receptores en la neurona post-sináptica. Entre ellos se describen el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), que permite la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ al interior de la célula intercambiándolo por K⁺, y los receptores

α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y kainato, siendo responsables de la entrada masiva de Ca^{2+} al interior de la neurona [11,24-26]. El Ca^{2+} es fundamental para el correcto funcionamiento de las neuronas; sin embargo, altos niveles de este ion en el espacio intracelular pueden generar un gradiente osmótico que provoca edema y lisis celular, desembocando en el desarrollo de diferentes procesos patológicos y en última instancia en muerte celular [27,28].

3.2. Estrés oxidativo

El cerebro es el órgano más activo metabólicamente: un 98% del consumo de oxígeno es reducido a ATP y el 2% restante se libera como especies reactivas de oxígeno (ROS, según sus siglas inglesas) [29,30]. Las ROS son necesarias para el correcto funcionamiento de numerosos sistemas enzimáticos, así como para la señalización en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico, y además participan en la modulación de la transmisión sináptica y no sináptica entre neuronas y glía [31]. Las fuentes de especies reactivas durante la isquemia-reoxigenación son múltiples, siendo las más relevantes el complejo respiratorio mitocondrial y el sistema de la xantina oxidasa (XO).

En la situación fisiológica existe un equilibrio entre la formación de ROS y su neutralización. Sin embargo, en condiciones de estrés, se puede generar un desequilibrio en este balance, pudiendo aumentar de forma nociva los niveles de ROS y desembocar en daño celular y tisular. Por ello, resulta necesaria la presencia y el correcto funcionamiento de un sistema de defensa antioxidante (SDA), el cual se desarrolla en la gestación con la finalidad de preparar al feto para la oxigenación postnatal [32,33]. Este sistema lleva a cabo la neutralización de las ROS mediante mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos. Los SDA no enzimáticos están constituidos por proteínas que fijan metales de transición (transferrina, ceruloplasmina, ferritina), vitaminas que bloquean la peroxidación lipídica (A, E y C) o compuestos de bajo peso molecular que reducen las ROS. Por su parte, entre las enzimas antioxidantes más relevantes aparecen la superóxido dismutasa, que cataliza la conversión de anión superóxido en peróxido de hidrógeno, la catalasa y la glutatión peroxidasa, que transforman el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [29,30,32].

Como hemos señalado previamente, el cerebro inmaduro presenta una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, en particular a la peroxidación inducida por radicales libres [34]. Además, durante la reperfusión y la reoxigenación, el SDA está sobrepasado por los altos niveles de ROS, desencadenando un daño celular secundario protagonizado por numerosos procesos bioquímicos, entre los que se encuentran fenómenos como la peroxidación lipídica, la desnaturalización de proteínas, la inactivación enzimática y la liberación de Ca^{2+} . El incremento en los niveles de este ion permite la activación de la óxido nítrico sintasa (tanto en su forma

endotelial como en su forma neuronal, presente en estas células y en astrocitos), responsable de la generación de más ROS y de especies reactivas de nitrógeno, tales como el óxido nítrico. El óxido nítrico puede combinarse con radicales superóxido produciendo peroxidonitrito, el cual, además de ser capaz de descomponerse espontáneamente formando nuevas especies reactivas de nitrógeno como radical hidroxilo, dióxido nitrógeno e ion nitrógeno, provoca disfunción mitocondrial y despolarización de la membrana. Consecuentemente, la reacción desencadenada implica a lípidos, proteínas y ADN, produciendo en último término daño neuronal [31,35].

3.3. Respuesta inflamatoria

Las ROS también contribuyen a la secreción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas, que a su vez acabarán favoreciendo la producción de una gran variedad de agentes citotóxicos, como metaloproteasas de la matriz, óxido nítrico y más ROS. La respuesta inmune es compleja e implica la participación de diferentes tipos celulares que contribuyen a la extravasación de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo, con la consiguiente exacerbación del daño [36-40].

Las células de la microglía actúan como sensores de daño cerebral y presentan la capacidad de transformarse morfológicamente, convirtiéndose en células móviles que migran hacia las áreas afectadas, con el objetivo, entre otros, de eliminar los detritos celulares [39,40]. Sin embargo, su función contribuye al daño secundario producido en la EHI, mediante la liberación de diversos mediadores proinflamatorios (citoquinas, ROS, óxido nítrico...). Todo ello favorece la aparición de muerte celular secundaria, creando un ciclo de daño que puede extenderse en el tiempo [41]. Por su parte, los astrocitos también pueden contribuir a la liberación de estos mediadores e influenciar la reacción inflamatoria local mediante su comunicación con las células vecinas, jugando un papel importante en la activación microglial mediante la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α según sus siglas inglesas) y la interleuquina (IL)-1 β , moléculas asociadas a daño neuronal tras la HI [37,42,43].

Recientemente, se ha descubierto que las neuronas también contribuyen en la respuesta inmune mediante la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) [44]. COX-2 es un conocido mediador en el daño cerebral en adultos con una gran relevancia tras el daño HI neonatal [37]. Por último, las células inmunes periféricas como linfocitos T, células B y células NK (del inglés Natural Killer) tienen la capacidad de regular su expresión y de infiltrarse en el parénquima cerebral. Estas células son capaces de sintetizar diversos factores neurotróficos, como el factor estimulador de colonias de granulocitos, el cual posee un papel dual en respuesta al daño cerebral. Por un lado, puede desempeñar un efecto neuroprotector y modular la proliferación celular; por otro lado, un exceso del mismo tiene un efecto contrario, reduciendo la neurogénesis [45]. La expresión de éste y de otros factores tróficos tras el daño cerebral por isquemia es modulada por COX-2, produciendo un desequilibrio en su síntesis y contribuyendo al daño secundario [37,46].

3.4. Muerte celular

La apoptosis, o muerte celular programada, es esencial para el desarrollo normal de los tejidos, especialmente en el desarrollo cerebral [47], y el equilibrio entre supervivencia y muerte celular requiere una gran regulación. La apoptosis es un proceso complejo que se desencadena a través de dos vías principales, una vía extrínseca mediante señales extracelulares como Fas o TNF- α , y una vía intrínseca en respuesta al daño en el ADN o por estrés celular, convergiendo a nivel mitocondrial [48,49]. La forma en que las células responden tras el daño producido depende principalmente de su intensidad y de su duración. Si se produce un daño continuado en el tiempo, se desencadenará una permeabilización catastrófica de la que la célula no podrá recuperarse [10,49]. Además, también influyen otros factores, como el subtipo celular de receptor de glutamato que haya sido estimulado, la depleción de energía y la disfunción mitocondrial, entre otros [50].

4. NEUROGÉNESIS

Durante el desarrollo embrionario, los procesos de apoptosis y de neurogénesis se acontecen de forma perfecta en el tiempo y en el espacio, generándose circuitos neuronales funcionales [51]. El descubrimiento de células madre postnatales y adultas en el SNC de mamíferos ha cambiado el dogma que se creía irrefutable de que el cerebro adulto es incapaz de remplazar las neuronas perdidas [52,53]. Aunque no se sabe con certeza si el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células madre o progenitoras se lleva a cabo en otras zonas del sistema nervioso central, se han identificado dos áreas neurogénicas que persisten tras el nacimiento: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (VLs) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo [54-56].

En la etapa postnatal, la capacidad de generación de nuevas neuronas y de células gliales en el nicho de los VLs contribuye a la plasticidad del cerebro del recién nacido y al remodelamiento tisular tras el daño [51,57-60]. Basándose en su potencial regenerativo, se ha comprobado que las células de la ZSV de los VLs pueden ser manipuladas molecularmente *in situ* para inducir su proliferación y emigración a los sitios del daño, o bien *in vitro* para posteriormente ser trasplantadas [54,61-64]. También se ha comprobado que las células madre neuronales tienen capacidad de autoregeneración y de proliferación, incrementándose cuando se ha producido un daño cerebral [65].

La proliferación, migración, supervivencia y diferenciación neuronal de estas células dependerá de numerosos factores, entre ellos la intensidad o el tipo de daño, la localización y su duración [66]. Aún se desconoce si las neuronas recién formadas se integran en la red neuronal

existente y si pueden desarrollar sus funciones adecuadamente en un microambiente de lesión cerebral [67], por lo que se hacen necesarias más investigaciones orientadas a buscar dianas terapéuticas con el objetivo de modular la neurogénesis tras el daño.

4.1. Neurogénesis tras HI

El daño celular y tisular desencadenado tras la HI puede ser generalizado, pudiendo afectar a los nichos neurogénicos presentes en el SNC. En este sentido, se ha descrito que, durante las primeras 24-48h tras el daño HI moderado-severo, se produce una extensa muerte celular en la ZSV [68,69], afectando principalmente a células madre neuronales y progenitores de oligodendrocitos. En un trabajo preliminar realizado por nuestro grupo de investigación utilizando lechones recién nacidos, hemos podido comprobar cómo se produce un incremento en la presencia de células retraídas y picnóticas en la ZSV 48h tras el daño HI (Fig. 2).

Se ha constatado una vulnerabilidad selectiva de los diversos tipos celulares que conforman la ZSV en función de la región en la que se localicen, observándose una mayor supervivencia en la zona más medial de la ZSV [70]. Mediante técnicas inmunohistoquímicas y el uso de marcadores específicos para células multipotentes y precursores inmaduros, se ha descrito la diferente respuesta al daño HI de pre-oligodendrocitos y los neuroblastos [71]. En nuestro laboratorio, hemos evaluado la expresión de la doblecortina o DCX (marcador específico de neuroblastos) en la ZSV de animales asfícticos, constatando una pérdida en el patrón de marcaje para esta proteína citoplasmática (Fig. 3).

Diversos trabajos señalan que un daño severo puede desencadenar una disminución de la proliferación celular en la ZSV [69,70]. Sin embargo, otros autores han descrito que, tras un intervalo de recuperación mayor, la morfología de la ZSV ipsilateral al hemisferio afectado cambia y su tamaño aumenta [69,72-74], fenómeno atribuido a una mayor proliferación celular [72,75]. En estudios preclínicos con un modelo HI en ratones se ha observado que también se produce una expansión de la ZSV del hemisferio contralateral [72], siendo los precursores más indiferenciados los responsables del incremento en su tamaño [75].

Para comprender mejor qué progenitores neuronales se forman tras la EHI se han realizado experimentos utilizando citometría de flujo con multimarcadores y así poder cuantificar la proporción de cada tipo celular. Se ha determinado que las células madre neuronales disminuyen, mientras que los progenitores multipotenciales aumentan, así como los progenitores de células gliales. Esto demuestra que la EHI altera la composición de la ZSV [76]. Posteriormente, las células que migran desde la ZSV tras el daño se diferenciarán en la misma proporción en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [69, 73, 77]. Sin embargo, se ha estimado que un 85% de las nuevas neuronas generadas como respuesta a la HI perinatal no sobreviven tras alcanzar la maduración [72]. Dentro de las células gliales, no se ha establecido si los nuevos

oligodendrocitos tienen la capacidad de producir mielina, mientras que el aumento en el número de astrocitos reactivos puede traducirse en una mayor producción de componentes de la matriz extracelular, como ácido hialurónico y condroitín sulfatos, pudiendo inhibir la diferenciación de los oligodendrocitos [78,79] y limitar la síntesis de mielina.

5. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

5.1. Hipotermia y daño HI

La única aproximación terapéutica existente frente a la EHI consiste en la hipotermia moderada. La temperatura corporal tiene un papel fundamental tras la agresión hipóxico-isquémica; así, un descenso de 3-4°C de manera precoz y mantenida durante 72 h disminuye la mortalidad y la incidencia de discapacidades como la parálisis cerebral o déficits cognitivos [80].

Actualmente, la aplicación de la hipotermia en las unidades de cuidados intensivos neonatales se realiza siguiendo un proceso estandarizado, donde prima la rápida bajada de la temperatura corporal y una posterior fase de recalentamiento progresiva y lenta [80, 81]. En la primera fase, se pretende alcanzar una temperatura diana de 33-34°C en la hipotermia corporal global y de 34-35°C en la hipotermia selectiva de la cabeza, enfriamiento llevado a cabo en 30-40 minutos. Durante la denominada fase de mantenimiento, el objetivo es mantener la temperatura diana con la menor variación posible, por un periodo de 48-72h. Finalmente, se procede a un proceso de recalentamiento lento, en un plazo de 6-12h y a una velocidad de 0,2-0,5°C/hora, de tal manera que se mantengan los efectos beneficiosos del enfriamiento [80, 81].

La eficacia neuroprotectora de la hipotermia se fundamenta en la disminución del metabolismo cerebral con el consiguiente descenso en las tasas de consumo de oxígeno, habiéndose establecido su aplicación durante las primeras 6 h de vida [81]. Aunque su mecanismo concreto de acción es todavía desconocido, se cree que es múltiple, participando en la supresión de diferentes vías de inflamación, la disminución de la formación de radicales libres y la reducción de la muerte celular programada y el volumen del infarto cerebral [4,82].

Aunque los criterios de inclusión para el tratamiento con hipotermia están definidos, es de gran relevancia determinar la gravedad de la EHI, puesto que se desconoce si las formas leves pueden beneficiarse de esta terapia. Así, es fundamental analizar la posible existencia de cualquier riesgo HI y la posterior evaluación del neonato. Los datos que definen una situación de hipoxia-isquemia durante el parto son desaceleraciones tardías en el registro cardiotocográfico, bradicardia mantenida, la presencia de meconio en el líquido amniótico, la presencia de un evento centinela (desprendimiento prematuro de la placenta, prolapso umbilical, rotura uterina) o un parto distócico o dificultoso. Ante cualquiera de estas situaciones, si se precisa de medidas de

resucitación o el test de APGAR a los 5 minutos es bajo, es preciso su traslado a una unidad de cuidados intensivos neonatal [83] Todos estos criterios dificultan el diagnóstico de esta afectación [84], retrasando el diagnóstico y la aplicación de la hipotermia. Además, no es una opción de tratamiento en países subdesarrollados puesto que requiere de equipos con un alto coste.

Pese a que la hipotermia ha supuesto una gran mejora en el manejo del recién nacido asfíctico y que los protocolos actuales parecen óptimos [85], su eficacia neuroprotectora es limitada, observándose que hasta un 45% de los pacientes tratados, especialmente con EHI grave, no presentan beneficio clínico [30,80]. Así, la comunidad científica ha comenzado a trabajar en la posible modulación de la respuesta neurogénica mediante el empleo de esta terapia, analizando si se produce un incremento en la proliferación celular y en la neurogénesis con el objetivo último de favorecer los procesos de reparación de las regiones cerebrales afectadas.

5.1.1. Hipotermia y neurogénesis

La relación descrita entre la hipotermia y la proliferación celular en los nichos neurogénicos del SNC tras HI neonatal es a día de hoy controvertida, con la existencia de trabajos apoyando el papel neuroregenerativo de esta terapia frente a estudios en los que se ha descrito un efecto antagónico.

En un estudio pre-clínico realizado con ratas neonatales, Xiong et al [82] describieron que la hipotermia produce un aumento en el número de neuronas maduras e inmaduras. Como hemos señalado previamente, un efecto conocido de esta terapia es su capacidad de reducir la apoptosis e interrumpir la necrosis neuronal temprana [86], por lo que, además, se vería disminuida la tasa de apoptosis de progenitores neuronales y de neuronas inmaduras. Otro beneficio descrito es la mejora del microambiente local, influyendo positivamente en la regulación y mantenimiento de las células madre [82,87].

Sin embargo, en otro ensayo realizado en ratas adultas, se ha demostrado que la hipotermia no tiene ningún efecto en la neurogénesis [88]. Hay que señalar que el modelo experimental empleado fue diferente y que el protocolo de hipotermia utilizado fue tan solo de 45 min a 33 ° C, frente a las 24 h a 32-33°C del estudio de Xiong et al [82].

Los mecanismos neuroendocrinológicos están regulados por la temperatura corporal. En investigaciones llevadas a cabo con ratas, se ha visto como un ambiente hipotérmico produce un aumento de corticoesteroides en plasma [89] y que éstos pueden disminuir la neurogénesis [90]. En línea con estos estudios, Kanagawa et al [91] demostraron que un protocolo de hipotermia en el que la temperatura diana fue inferior a la empleada en los estudios clínicos, produjo un descenso en el número de células positivas para el marcador de proliferación celular bromodesoxiuridina o BrdU, tanto en la ZSV de los VLs como en la ZSG del hipocampo, enfatizando en la importancia

del protocolo de hipotermia utilizado [85]. Además, existen diversos factores de crecimiento cuyo papel es relevante en la proliferación y diferenciación de células madre neuronales, cuya expresión podría verse influenciada por la hipotermia. Así, diversas investigaciones apuntan a un incremento en la expresión del factor neurotrófico derivado de la glía [92], del factor de crecimiento vascular endotelial [93] y de Bcl-2 (o B-cell lymphoma 2 en inglés, con efecto antiapoptótico principalmente a través de la vía mitocondrial) [82], acompañado del descenso en la temperatura corporal.

Con el objetivo de obtener resultados óptimos mediante la modulación de la capacidad neurogénica cerebral a través de la hipotermia moderada, algunos autores establecen que deben definirse claramente las pautas a seguir en la utilización de esta terapia [94]. Además, la complejidad de la fisiopatología de la HI neonatal hace necesario incidir en que la única forma de conseguir un tratamiento efectivo es mediante el empleo de estrategias terapéuticas que intervengan en múltiples niveles de protección, incluyendo el incremento de la supervivencia celular, la regeneración y la modulación de la neurogénesis.

5.2. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una citoquina glicoproteica que estimula la producción de glóbulos rojos. Se ha constatado la existencia del receptor de EPO en progenitores neuroepiteliales del cerebro de embriones y fetos, el cual tiene la capacidad de estimular a dichos progenitores y prevenir su muerte [95]. Además, la EPO es capaz de promover la neurogénesis y la oligodendrogliosis en etapas tempranas y tardías tras infarto neonatal [96]. Las acciones de la EPO también incluyen incrementar la regeneración axonal, la revascularización, reducir el daño tisular e inducir la recuperación y la conectividad de la sustancia blanca [97], funciones esenciales para una correcta recuperación tras la fase tardía de la EHI [23,97-99].

Estudios en modelos animales han demostrado que la concentración de EPO aumenta con la hipoxia. Mediante una reducción sistémica del O₂ en ratones (7% de O₂ durante 30 min), los niveles de ARN mensajero de la EPO se incrementaron considerablemente tras 4h de exposición, un efecto que se vio prolongado en el tiempo [100]. De manera similar, sometiendo a hipoxia *in vitro* a las células progenitoras de la ZSV, se indujo la expresión de EPO, proceso vinculado con la diferenciación neuronal [101]. Otros ensayos en los que se ha infundido EPO en los VLs de ratones adultos han mostrado un incremento en el número de células progenitoras [69,101].

Pese a que el conocimiento sobre su utilidad terapéutica es limitado, todo apunta a que la EPO exógena produce un aumento de la respuesta regenerativa de la ZSV [95]. Estudios en ratas postnatales en los que se ha inyectado EPO intraperitoneal tras 48h de hipoxia-isquemia mostraron un incremento en la producción de neuroblastos y de progenitores de oligodendrocitos,

así como en la potenciación de su maduración [96,102]. De forma similar, esta citoquina también tiene influencia en la población astrocitaria, produciendo un aumento de la misma [69,98].

La EPO tiene efectos citoprotectores, anti-apoptóticos, anti-oxidativos y anti-inflamatorios [103-108], es decir, interviene en muchos de los procesos que participan en la producción del daño cerebral, favoreciendo el gran interés en su integración en el tratamiento de la EHI neonatal junto con la actual terapia existente, la hipotermia. Pese a todo, presenta algunas limitaciones, ya que en un estudio realizado en ratones se ha podido observar que su efecto neuroprotector tras HI es dosis-dependiente y solo presente en el sexo femenino [97].

5.3. Cannabinoides

El sistema endocannabinoide es un sistema neuromodulador endógeno relacionado con numerosas funciones biológicas, desarrolladas tanto en el SNC como en el periférico, a través de una serie de receptores (CBRs por sus siglas inglesas) que aparecen diseminados en distintos tipos celulares. En particular, en el SNC este sistema actúa controlando la coordinación motora, la memoria, el aprendizaje, la temperatura corporal, el apetito y el dolor [109-111]. Los endocannabinoides se producen en respuesta a la despolarización por la activación de enzimas calcio-dependientes. Gracias al receptor CB1R, ubicado en la membrana de las neuronas presinápticas, presentan la capacidad de modular la intensidad y duración de la transmisión sináptica [112]. Por otro lado, la activación de CB2R, localizado en células inmunes, ha mostrado tener un efecto inhibitorio en la activación, motilidad celular y secreción de mediadores inflamatorios [112-114]. Estas capacidades del sistema endocannabinoide han despertado interés en sus posibilidades como moléculas terapéuticas para el tratamiento de patologías del SNC, incluyendo el daño cerebral perinatal [111,115,116].

El sistema endocannabinoide ha demostrado desarrollar un efecto neuroprotector tras el daño neuronal, ya que previene la excitotoxicidad producida por el glutamato, la acumulación intracelular del calcio, la activación microglial, la reactividad neurovascular, la respuesta inflamatoria y la muerte celular [117-120]. También tiene capacidad para modular la proliferación de células madre a través del CB2R [121-123]. En cuanto al CB1R, parece promover la diferenciación de las células madre hacia el linaje neuronal bajo condiciones de excitotoxicidad [122]. Esto puede indicar que, según el contexto en el que CB1R sea activado, puede condicionar la proliferación de células madre hacia un linaje específico [124].

La activación de los receptores cannabinoides mediante agentes exógenos también ha sido estudiada. El empleo del WIN55,212-2, un agonista sintético de CB1R y CB2R, ha conseguido mejorar los mecanismos de recuperación y reparación neuronal en un modelo experimental HI neonatal [111], efecto beneficioso que se ha extendido a la sustancia blanca subcortical [125]. Ensayos posteriores con este compuesto y otros agonistas revelaron que su

administración induce una mejora en la proliferación de oligodendrocitos [126] y que éstos sobreviven y se diferencian en sus formas maduras, con capacidad de promover la mielinización de la cápsula externa del núcleo caudado afectado por la HI [127]. Basándonos en estos resultados prometedores mostrados tanto por el WIN55,212-2 como por otros agonistas sintéticos, parece necesaria la caracterización del efecto neurogénico de cannabinoides sin efectos psicoactivos, como el cannabidiol, en modelos experimentales de asfixia perinatal, efectos que ya han sido descritos en otros tipos de daño cerebral [128].

5.4. Células madre mesenquimales

Las células madre contribuyen a regular la homeostasis y a reparar los tejidos aportando nuevas células diferenciadas [129]. El empleo de esta terapia en modelos de daño cerebral agudo pretende restaurar el tejido dañado a través de la formación de nuevas neuronas, vasos sanguíneos (angiogénesis) y mediante el fomento de la sinaptogénesis [130]. Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes, con capacidad de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos, y también hacia neuronas y astrocitos [131,132].

Se han realizado diversos estudios valorando la eficacia de la administración intranasal de CMM, describiéndose su efecto beneficioso tras el daño HI, disminuyendo el tamaño de la lesión y mejorando el comportamiento cognitivo y motor [133-137]. Esta terapia ha demostrado además ser capaz de restaurar la pérdida de proyecciones del cuerpo estriado tras la EHI, efecto realizado de forma independiente de su dosis, mientras que dosis altas son capaces incluso de mejorar la función motora [130].

La administración de CMM derivadas de médula ósea en etapas más avanzadas de daño también es capaz de aumentar la sinaptogénesis, con la consiguiente mejora en la integración de neuronas recién formadas y de aquellas que han sobrevivido, como se ha observado tras su administración una semana después del daño [130]. Además, este efecto se extiende a la modulación de la respuesta inmune, mediante la atenuación de la activación de microglía y macrófagos [132,138], reduciendo así la respuesta inflamatoria 21 días después del daño y aumentando las posibilidades de supervivencia neuronal [130,133].

5.5. Otras terapias

Además de las ya descritas, son muchas las dianas terapéuticas sobre las que se está trabajando actualmente con el objetivo de reducir al máximo las secuelas neurológicas de los recién nacidos asfícticos.

La melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal cuya función principal es regular el ritmo circadiano. Sin embargo, esta molécula presenta otros muchos efectos y ahora se conoce que se sintetiza también en órganos extra-pineales, como en el sistema inmune, el cerebro y la médula ósea, entre otros [139]. Además de tener propiedades neuroprotectoras frente al daño HI [38], tales como reducir el estrés oxidativo o presentar actividad antiapoptótica y antiinflamatoria, desempeña un papel neuroregenerativo. Se ha demostrado que la melatonina, a través de la activación de su receptor MT2 localizado en el hipotálamo, estimula la neurogénesis y la proliferación celular [139]. Además, estudios *in vitro* han descrito la capacidad de esta hormona para incrementar la supervivencia de las CMM, efecto que se ha visto inhibido mediante el empleo de un fármaco antagonista de los receptores de la melatonina, con mayor afinidad por el MT2 [140,141].

La humanina es un péptido conocido por sus efectos anti-apoptóticos en el daño isquémico [142,143]. Se han realizado investigaciones utilizando S14G-humanina, un mutante de alta potencia, observándose que tras la administración de la misma se produce un aumento en la cantidad de oligodendrocitos y en la mielinización axonal, previniendo la atrofia cerebral y mejorando la recuperación neurológica funcional [144].

Otra opción terapéutica sobre la que se han realizado investigaciones es el sildenafil, un fármaco utilizado en la disfunción eréctil y la hipertensión pulmonar que actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa 5, evitando de esta forma la hidrólisis del guanosín monofosfato cíclico y favoreciendo la neurogénesis [145]. Se ha apreciado un aumento significativo de la población de neuronas inmaduras en la ZSV ipsilateral a la lesión HI y en el cuerpo estriado de ratones a los que se administró este fármaco. Además, tiene la capacidad de mejorar la recuperación funcional [145].

La metformina, un antidiabético oral utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, es otro fármaco que podría tener un efecto beneficioso en la EHI. En ensayos *in vitro* se ha podido comprobar que la administración de metformina en el cerebro neonatal durante 7 días puede favorecer la expansión y migración de precursores neuronales, con el consiguiente efecto beneficioso en la función sensitivo-motora [146].

Por su parte, el factor de crecimiento fibroblástico básico es un polipéptido con potentes efectos tróficos, protectores y neuroreparativos [147]. En estos experimentos se comprobó que el aumento de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo tras HI era máximo a los 7-14 días, coincidiendo de forma similar con la expresión de ARN mensajero del factor de crecimiento fibroblástico básico. Además, estos mismos autores pudieron comprobar que la administración de este factor de crecimiento exógeno también producía un incremento de la proliferación celular tras el daño en el giro dentado [148].

6. CONCLUSIONES

Pese a que el efecto terapéutico de la hipotermia tras asfixia perinatal abarca la supresión de diferentes vías inflamatorias, la disminución en la formación de radicales libres y la reducción de la muerte celular programada o apoptosis, a día de hoy no se puede afirmar con rotundidad que esta terapia favorezca los procesos de neuroreparación tras la asfixia perinatal. Por otro lado, presenta varias limitaciones, como un tiempo reducido en el que su aplicación es efectiva, y la necesidad de un equipo específico que no es sustentable en algunos hospitales o en países en vías de desarrollo.

Con el objetivo de inducir una modulación terapéutica de la neurogénesis, la administración de compuestos como la EPO o los cannabinoides o de CMM ha mostrado resultados prometedores tanto en ensayos *in vitro* como mediante el empleo de modelos animales. Para el correcto desarrollo e implementación de estos agentes terapéuticos, parece necesario que su eficacia deba ser ensayada en estudios clínicos, con el fin último de poder incorporar estos nuevos tratamientos en las unidades de cuidados intensivos neonatales, ya sea de forma independiente o en combinación con la hipotermia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum asphyxia and cerebral palsy. *Pediatrics*. 1988 Aug;82(2):240-9.
2. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Clinical aspects. En: Volpe JJ (Ed.) *Neurology of the Newborn*. WB Saunders Co: Philadelphia. 1995, pp 314-369.
3. Nelson KB, Leviton A. How much of neonatal encephalopathy is due to birth asphyxia? *Am J Dis Child*. 1991 Nov;145(11):1325-31.
4. Blanco D, Garcia-Alix A, Valverde E, Tenorio V, Vento M, Cabanas F, et al. Neuroprotection with hypothermia in the newborn with hypoxic-ischaemic encephalopathy. Standard guidelines for its clinical application. *An Pediatr (Barc)*. 2011 Nov;75(5):341.e1,341.20.
5. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010 Jun;86(6):329-38.
6. Lee AC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res*. 2013 Dec;74 Suppl 1:50-72.
7. Lawn JE, Kinney M, Lee AC, Chopra M, Donnay F, Paul VK, et al. Reducing intrapartum-related deaths and disability: can the health system deliver? *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 Oct;107 Suppl 1:S123,40, S140-2
8. Arnaez J, Garcia-Alix A, Arca G, Valverde E, Caserio S, Moral MT, et al. Incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy and use of therapeutic hypothermia in Spain. *An Pediatr (Barc)*. 2017 Jul 29.
9. Fleiss B, Gressens P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol*. 2012;11:556-66.
10. Leaw B, Nair S, Lim R, Thornton C, Mallard C, Hagberg H. Mitochondria, Bioenergetics and Excitotoxicity: New Therapeutic Targets in Perinatal Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2017 Jul 12;11:199.
11. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015 Nov;100(6):F541-52.
12. Sie LT, van der Knaap MS, Oosting J, de Vries LS, Lafeber HN, Valk J. MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia. *Neuropediatrics*. 2000 Jun;31(3):128-36.
13. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 2001 Jun;49(6):735-41.
14. Johnston MV, Nakajima W, Hagberg H. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. *Neuroscientist*. 2002 Jun;8(3):212-20.
15. Bennet L, Booth L, Gunn AJ. Potential biomarkers for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010 Oct;15(5):253-60.
16. Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, et al. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res*. 1989 May;25(5):445-51.
17. Iwata O, Iwata S, Thornton JS, De Vita E, Bainbridge A, Herbert L, et al. "Therapeutic time window" duration decreases with increasing severity of cerebral

- hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. *Brain Res.* 2007 Jun 18;1154:173-80.
18. Hope PL, Costello AM, Cady EB, Delpy DT, Tofts PS, Chu A, et al. Cerebral energy metabolism studied with phosphorus NMR spectroscopy in normal and birth-asphyxiated infants. *Lancet.* 1984 Aug 18;2(8399):366-70.
 19. Roth SC, Baudin J, Cady E, Johal K, Townsend JP, Wyatt JS, et al. Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years. *Dev Med Child Neurol.* 1997 Nov;39(11):718-25.
 20. Hanrahan JD, Cox IJ, Azzopardi D, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD, et al. Relation between proton magnetic resonance spectroscopy within 18 hours of birth asphyxia and neurodevelopment at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol.* 1999 Feb;41(2):76-82.
 21. Towfighi J, Zec N, Yager J, Housman C, Vannucci RC. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol.* 1995;90(4):375-86.
 22. Alvarez-Diaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-i-Soler A, Alvarez-Diaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology.* 2007;92(4):227-35.
 23. Wu Q, Chen W, Sinha B, Tu Y, Manning S, Thomas N, et al. Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discov Today.* 2015 Nov;20(11):1372-81.
 24. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med.* 2004 Nov 4;351(19):1985-95.
 25. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008 Sep;55(3):310-8.
 26. Titomanlio L, Fernandez-Lopez D, Manganozzi L, Moretti R, Vexler ZS, Gressens P. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. *Pediatr Neurol.* 2015 Jun;52(6):566-84.
 27. Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984 Sep;4(3):350-61.
 28. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010 Feb;47(2):122-9.
 29. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:524-51.
 30. Nunez A, Benavente I, Blanco D, Boix H, Cabanas F, Chaffanel M, et al. Oxidative stress in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *An Pediatr (Barc).* 2017 Jun 23.
 31. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006 Feb 1;40(3):388-97.
 32. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013 Feb 8;1:244-57.
 33. Vento M, Hummler H, Dawson JA, Escobar J, Kuligowski J. Use of oxygen in the resuscitation of neonates. In Dennery PABG, Saugstad OD, editores. *Oxidative*

- Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. New York, NY: Humana Press (Springer Science & Business Media); 2014.
34. Kumar A, Mittal R, Khanna HD, Basu S. Free radical injury and blood-brain barrier permeability in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2008 Sep;122(3):e722-7.
 35. van den Tweel ER, van Bel F, Kavelaars A, Peeters-Scholte CM, Haumann J, Nijboer CH, et al. Long-term neuroprotection with 2-iminobiotin, an inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase, after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Jan;25(1):67-74.
 36. Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Tang FR, Ling EA. Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the developing hippocampus. *Brain Pathol*. 2008 Oct;18(4):533-47.
 37. Fathali N, Khatibi NH, Ostrowski RP, Zhang JH. The evolving landscape of neuroinflammation after neonatal hypoxia-ischemia. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:93-100.
 38. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martinez-Ibarguen A, Hilario E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. *Int J Mol Sci*. 2013 Apr 29;14(5):9379-95.
 39. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8.
 40. Leonardo CC, Pennypacker KR. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2009 Apr 15;6:13,2094-6-13.
 41. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol*. 2009 Dec;36(4):835,58, vii.
 42. Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol*. 2002 Oct;12(4):475-81.
 43. Ovanesov MV, Ayhan Y, Wolbert C, Moldovan K, Sauder C, Pletnikov MV. Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation*. 2008 Nov 11;5:50,2094-5-50.
 44. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2006 Aug;112(2):195-204.
 45. Linker R, Gold R, Luhder F. Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(1):43-68.
 46. Hofer M, Pospisil M, Hola J, Vacek A, Streitova D, Znojil V. Inhibition of cyclooxygenase 2 in mice increases production of g-csf and induces radioprotection. *Radiat Res*. 2008 Nov;170(5):566-71.
 47. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):695-700.
 48. Wang X, Carlsson Y, Basso E, Zhu C, Rousset CI, Rasola A, et al. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci*. 2009 Feb 25;29(8):2588-96.

49. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):1-4.
50. Northington FJ, Zelaya ME, O'Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, Hagberg H, et al. Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience*. 2007 Nov 23;149(4):822-33.
51. Asrican B, Paez-Gonzalez P, Erb J, Kuo CT. Cholinergic Circuit Control of Postnatal Neurogenesis. *Neurogenesis (Austin)*. 2016;3(1):10.1080/23262133.2015.1127310. Epub 2016 Jan 13.
52. Ihrie RA, Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):674-86.
53. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1219-27.
54. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):2074-7.
55. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313-7.
56. Kornack DR, Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science*. 2001 Dec 7;294(5549):2127-30.
57. Benner EJ, Luciano D, Jo R, Abdi K, Paez-Gonzalez P, Sheng H, et al. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*. 2013 May 16;497(7449):369-73.
58. Livneh Y, Adam Y, Mizrahi A. Odor processing by adult-born neurons. *Neuron*. 2014 Mar 5;81(5):1097-110.
59. Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, et al. Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J Neurosci*. 2014 Apr 23;34(17):5788-99.
60. Faiz M, Sachewsky N, Gascon S, Bang KW, Morshead CM, Nagy A. Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell*. 2015 Nov 5;17(5):624-34.
61. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*. 1999 Apr;156(2):333-44.
62. Ostenfeld T, Tai YT, Martin P, Deglon N, Aebischer P, Svendsen CN. Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons. *J Neurosci Res*. 2002 Sep 15;69(6):955-65.
63. Yu SJ, Tseng KY, Shen H, Harvey BK, Airavaara M, Wang Y. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats. *PLoS One*. 2013 Dec 2;8(12):e81750.
64. Gil-Perotin S, Duran-Moreno M, Cebrian-Silla A, Ramirez M, Garcia-Belda P, Garcia-Verdugo JM. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013 Sep;296(9):1435-52.

65. Ziemka-Nalecz M, Zalewska T. Endogenous neurogenesis induced by ischemic brain injury or neurodegenerative diseases in adults. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2012;72(4):309-24
66. Chang EH, Adorjan I, Mundim MV, Sun B, Dizon ML, Szele FG. Traumatic Brain Injury Activation of the Adult Subventricular Zone Neurogenic Niche. *Front Neurosci*. 2016 Aug 2;10:332.
67. Yu TS, Washington PM, Kernie SG. Injury-Induced Neurogenesis: Mechanisms and Relevance. *Neuroscientist*. 2016 Feb;22(1):61-71.
68. Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MJ, Meyers RL, Vannucci SJ. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci*. 2001;23(3):234-47.
69. Niimi Y, Levison SW. Pediatric brain repair from endogenous neural stem cells of the subventricular zone. *Pediatr Res*. 2018 Jan;83(1-2):385-96.
70. Brazel CY, Rosti RT, 3rd, Boyce S, Rothstein RP, Levison SW. Perinatal hypoxia/ischemia damages and depletes progenitors from the mouse subventricular zone. *Dev Neurosci*. 2004 Mar-Aug;26(2-4):266-74.
71. Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Jul;24(7):814-25.
72. Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis*. 2004 Aug;16(3):585-95.
73. Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 2005 Sep;58(3):600-6.
74. Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience*. 2006 May 12;139(2):555-64.
75. Felling RJ, Snyder MJ, Romanko MJ, Rothstein RP, Ziegler AN, Yang Z, et al. Neural stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. *J Neurosci*. 2006 Apr 19;26(16):4359-69.
76. Buono KD, Goodus MT, Guardia Clausi M, Jiang Y, Loporchio D, Levison SW. Mechanisms of mouse neural precursor expansion after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2015 Jun 10;35(23):8855-65.
77. Yang Z, Covey MV, Bitel CL, Ni L, Jonakait GM, Levison SW. Sustained neocortical neurogenesis after neonatal hypoxic/ischemic injury. *Ann Neurol*. 2007 Mar;61(3):199-208.
78. Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, et al. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med*. 2005 Sep;11(9):966-72.
79. Pendleton JC, Shamblott MJ, Gary DS, Belegu V, Hurtado A, Malone ML, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit oligodendrocyte myelination through PTPsigma. *Exp Neurol*. 2013 Sep;247:113-21.
80. Roka A, Azzopardi D. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010 Jun;86(6):361-7.

81. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med*. 2009 Oct 1;361(14):1349-58.
82. Xiong M, Cheng GQ, Ma SM, Yang Y, Shao XM, Zhou WH. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. *Neurochem Int*. 2011 May;58(6):625-33.
83. Arnaez J, Vega C, Garcia-Alix A, Gutierrez EP, Caserio S, Jimenez MP, et al. Multicenter program for the integrated care of newborns with perinatal hypoxic-ischemic insult (ARAHIP). *An Pediatr (Barc)*. 2015 Mar;82(3):172-82.
84. Janowska J, Sypecka J. Therapeutic Strategies for Leukodystrophic Disorders Resulting from Perinatal Asphyxia: Focus on Myelinating Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol*. 2017 Jun 28.
85. Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, Chandrasekaran M, Faulkner SD, Kerényi A, et al. Brain cell death is reduced with cooling by 3.5 degrees C to 5 degrees C but increased with cooling by 8.5 degrees C in a piglet asphyxia model. *Stroke*. 2015 Jan;46(1):275-8.
86. Edwards AD, Yue X, Squier MV, Thoresen M, Cady EB, Penrice J, et al. Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Dec 26;217(3):1193-9.
87. Gonzalez FF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther*. 2008 Oct;120(1):43-53.
88. Lasarzik I, Winkelheide U, Thal SC, Benz N, Lorscher M, Jahn-Eimermacher A, et al. Mild hypothermia has no long-term impact on postischemic neurogenesis in rats. *Anesth Analg*. 2009 Nov;109(5):1632-9.
89. Okuda C, Miyazaki M, Kuriyama K. Hypothalamic control of pituitary and adrenal hormones during hypothermia. *Psychoneuroendocrinology*. 1986;11(4):415-27.
90. Gould E, Woolley CS, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *J Comp Neurol*. 1991 Nov 15;313(3):486-93.
91. Kanagawa T, Fukuda H, Tsubouchi H, Komoto Y, Hayashi S, Fukui O, et al. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat. *Brain Res*. 2006 Sep 21;1111(1):36-40.
92. Xiong M, Yang Y, Chen GQ, Zhou WH. Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain Res Bull*. 2009 Aug 14;79(6):351-7.
93. Constantinides CA, Tyrizis SI, Evangelou C, Kyroudi A, Liatsikos E, Karamessinis P, et al. Vascular endothelial growth factor protein expression in a renal ablation rabbit model under prolonged warm and cold ischemia. *Am J Nephrol*. 2008;28(3):438-45.
94. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Feb 22;13(4):267-78.
95. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*. 2006 Jan 25;26(4):1269-74.
96. Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, Zhang W, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke*. 2010 May;41(5):1032-7.

97. Fan X, Heijnen CJ, van der KOOIJ MA, Groenendaal F, van Bel F. Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice. *Pediatr Res*. 2011 Jan;69(1):56-61.
98. Gonzalez FF, Larphaveesarp A, McQuillen P, Derugin N, Wendland M, Spadafora R, et al. Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke. *Stroke*. 2013 Mar;44(3):753-8.
99. Jantzie LL, Miller RH, Robinson S. Erythropoietin signaling promotes oligodendrocyte development following prenatal systemic hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res*. 2013 Dec;74(6):658-67.
100. Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Dec;279(6):E1242-8.
101. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9733-43.
102. Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, et al. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *Stem Cells*. 2012 Oct;30(10):2234-47.
103. Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, et al. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate*. 2004;85(1):51-4.
104. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Erythropoietin and oxidative stress. *Curr Neurovasc Res*. 2008 May;5(2):125-42.
105. Juul SE, Beyer RP, Bammler TK, McPherson RJ, Wilkerson J, Farin FM. Microarray analysis of high-dose recombinant erythropoietin treatment of unilateral brain injury in neonatal mouse hippocampus. *Pediatr Res*. 2009 May;65(5):485-92.
106. Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, et al. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma*. 2010 Jan;27(1):205-15.
107. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol*. 2014 Oct;51(4):481-8.
108. Hurn PD, Vannucci SJ, Hagberg H. Adult or perinatal brain injury: does sex matter? *Stroke*. 2005 Feb;36(2):193-5.
109. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*. 2005 Jan-Feb;40(1):2-14.
110. Breivogel CS, Sim-Selley LJ. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry*. 2009 Apr;21(2):113-21.
111. Fernandez-Lopez D, Lizasoain I, Moro MA, Martinez-Orgado J. Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sci*. 2013 Jul 10;3(3):1043-59.
112. Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*. 2007 Apr;13(2):127-37.

113. Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology*. 2010 Aug;215(8):588-97.
114. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res*. 2011 Oct;51(1):26-38.
115. Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jan 20;11:e3.
116. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Alvarez-Granda L, Hilario E. Therapeutic potential of the endocannabinoid system in perinatal asphyxia. *Rev Neurol*. 2011 Dec 16;53(12):758-64.
117. Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. 2003 Oct 3;302(5642):84-8.
118. Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):312-6.
119. Zhuang SY, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson RE, et al. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology*. 2005 Jun;48(8):1086-96.
120. Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:244-53.
121. Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, et al. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*. 2006 Feb 1;26(5):1551-61.
122. Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):23892-8.
123. Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 2006 Nov;20(13):2405-7.
124. Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 2005 Oct;19(12):1704-6.
125. Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Rubio-Araiz A, Gomez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Eur J Neurosci*. 2007 Sep;26(6):1548-59.
126. Gomez O, Sanchez-Rodriguez A, Le M, Sanchez-Caro C, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug;163(7):1520-32.
127. Fernandez-Lopez D, Pradillo JM, Garcia-Yebenes I, Martinez-Orgado JA, Moro MA, Lizasoain I. The cannabinoid WIN55212-2 promotes neural repair after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2010 Dec;41(12):2956-64.
128. Mori MA, Meyer E, Soares LM, Milani H, Guimaraes FS, de Oliveira RMW. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and

- functional recovery after brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Apr 3;75:94-105.
129. Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*. 2013 Oct;80(3):588-601.
 130. Cameron SH, Alwakeel AJ, Goddard L, Hobbs CE, Gowing EK, Barnett ER, et al. Delayed post-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells is neurorestorative of striatal medium-spiny projection neurons and improves motor function after neonatal rat hypoxia-ischemia. *Mol Cell Neurosci*. 2015 Sep;68:56-72.
 131. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des*. 2005;11(10):1255-65.
 132. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, Hu X, Yu SP. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis*. 2012 Jun;46(3):635-45.
 133. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *J Neurosci*. 2010 Jul 14;30(28):9603-11.
 134. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain. *Brain Behav Immun*. 2011 Oct;25(7):1342-8.
 135. van Velthoven CT, Braccioli L, Willemen HL, Kavelaars A, Heijnen CJ. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells after neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Ther*. 2014 Mar;22(3):645-54.
 136. Donega V, van Velthoven CT, Nijboer CH, van Bel F, Kas MJ, Kavelaars A, et al. Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement. *PLoS One*. 2013;8(1):e51253.
 137. Donega V, Nijboer CH, van Tilborg G, Dijkhuizen RM, Kavelaars A, Heijnen CJ. Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury. *Exp Neurol*. 2014 Nov;261:53-64.
 138. Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14638-43.
 139. Chern CM, Liao JF, Wang YH, Shen YC. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 1;52(9):1634-47.
 140. Tang Y, Cai B, Yuan F, He X, Lin X, Wang J, et al. Melatonin Pretreatment Improves the Survival and Function of Transplanted Mesenchymal Stem Cells after Focal Cerebral Ischemia. *Cell Transplant*. 2014 Oct;23(10):1279-91.
 141. Ramos E, Patino P, Reiter RJ, Gil-Martin E, Marco-Contelles J, Parada E, et al. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med*. 2017 Mar;104:32-53.
 142. Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, et al. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci*. 2001 Dec 1;21(23):9235-45.

143. Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke*. 2006 Oct;37(10):2613-9.
144. Chen J, Sun M, Zhang X, Miao Z, Chua BH, Hamdy RC, et al. Increased oligodendrogenesis by humanin promotes axonal remyelination and neurological recovery in hypoxic/ischemic brains. *Hippocampus*. 2015 Jan;25(1):62-71.
145. Engels J, Elting N, Braun L, Bendix I, Herz J, Felderhoff-Muser U, et al. Sildenafil Enhances Quantity of Immature Neurons and Promotes Functional Recovery in the Developing Ischemic Mouse Brain. *Dev Neurosci*. 2017;39(1-4):287-97.
146. Dadwal P, Mahmud N, Sinai L, Azimi A, Fatt M, Wondisford FE, et al. Activating Endogenous Neural Precursor Cells Using Metformin Leads to Neural Repair and Functional Recovery in a Model of Childhood Brain Injury. *Stem Cell Reports*. 2015 Aug 11;5(2):166-73.
147. Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, Zhou Z, Altememi N, Hagood S, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009 Mar;216(1):56-65.
148. Zhu H, Qiao L, Sun Y, Yin L, Huang L, Jiang L, et al. Basic fibroblast growth factor enhances cell proliferation in the dentate gyrus of neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Lett*. 2018 Apr 23;673:67-72.
149. Koob AO, Harris BT, Duhaime AC. Cellular genesis in the postnatal piglet. *Int J Dev Neurosci*. 2008; 26:641-6.

Neonatal hypoxia-ischemia: cellular and molecular brain damage and therapeutic modulation of neurogenesis

Introduction. Perinatal asphyxia remains a major cause of both mortality and neurological morbidity. Neonatal encephalopathy affects to 1-3/1000 newborns, leading to significant brain damage and childhood disability. The only standard therapy is therapeutic hypothermia, whose efficacy, despite proved, is limited, being partially effective.

Development. The capacity of hypothermia in promoting cell proliferation in the neurogenic niches of the central nervous system remains subject of investigation. The use of therapeutic agents such as erythropoietin and cannabinoids and mesenchymal stem cells have shown promising results in experimental models of perinatal asphyxia, being able of modulate neurogenesis, neuronal plasticity and neuroreparation processes after hypoxic-ischemic brain injury.

Conclusions. The effects of these therapies in clinics are still unknown, so as if the newborn cells will be able to effectively integrate in the existing neuronal networks or if they will develop their proper functions in a brain-damaged microenvironment, thus being necessary new works focused on the evaluation of the real potential of these therapies in the modulation of neurogenesis after neonatal hypoxia-ischemia.

PIES DE FIGURA

Figura 1. Fisiopatología del evento HI. La asfixia perinatal genera un descenso del flujo sanguíneo cerebral que produce una caída de las reservas de alta energía como el ATP y aumento del ácido láctico. La acumulación masiva de glutamato (triángulos) conlleva la pérdida de homeostasis iónica de la membrana neuronal, con la consiguiente acumulación de K^+ en el espacio extracelular y de Na^+ y Ca^{2+} en el intracelular, desencadenando la despolarización de la membrana post-sináptica, daño mitocondrial, producción de radicales libres y edema. Estos procesos favorecen una cascada neuroinflamatoria mediada por la infiltración de células inmunes periféricas, la liberación de factores pro-inflamatorios (COX-2) y la activación microglial. Todos estos eventos pueden desencadenar en última instancia muerte celular.

Figura 2. Microfotografías obtenidas de secciones cerebrales teñidas mediante hematoxilina & eosina al nivel de la zona subventricular de lechones recién nacidos (edad postnatal: 48 horas) [85]. Los grupos experimentales, animales y protocolos, así como la obtención, procesamiento y tinción de las muestras, fueron realizados acorde a la referencia [85]. Las fotografías A y C corresponden a animales control, mientras que las imágenes B y D corresponden a animales sometidos a un evento hipóxico-isquémico. Nótese la presencia de células retraídas y picnóticas en la fotografía D, indicadoras de muerte celular y daño tisular. Aumentos: A y B: 5x; C y D: 40x. VL: ventrículo lateral. PvWM: sustancia blanca periventricular, en inglés. ZSV: zona subventricular.

Figura 3. Microfotografías obtenidas de secciones cerebrales al nivel de la zona subventricular. A) Inmunomarcaje mediante el empleo del antígeno doblecortina o DCX (marcador de neuroblastos). B) Localización de núcleos celulares mediante tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol o DAPI (marcador de núcleos celulares). C) Colocalización de DCX y DAPI. Las flechas señalan neuroblastos (positivos para DCX y DAPI) y las puntas de flecha señalan endimocitos (positivos para DAPI pero sin marcaje para DCX). D y E) Inmunomarcaje de neuroblastos en animales del grupo control (D) y del grupo hipóxico-isquémico (E). Nótese el descenso en el patrón de marcaje para los animales de este segundo grupo. Aumentos: 40x. VL: ventrículo lateral. PvWM: sustancia blanca periventricular, en inglés. ZSV: zona subventricular. Barras: 100um.