

Acción neuroprotectora del flavonoide quercetina tras asfixia perinatal en un modelo de rata

Maestría en Ciencias Biológicas

Sub área Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

Viviana Cardozo

2018

Orientadora: Gabriela Bedó

Co-orientadora: Adriana Parodi



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Agradecimientos

A la agencia nacional de investigación (ANII), a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y a Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por el apoyo económico brindado.

A mis orientadoras, Gabriela y Adriana por todo el conocimiento brindado, pero también por su calidez y cercanía. ¡Ambas son grandes maestras!

A los miembros del tribunal evaluador Dra. Andrea Villarino, Dra. Natalia Uriarte y Dra. María José Arezo por dedicar parte de su valioso tiempo a la corrección de esta tesis.

A toda la sección Fisiología de Facultad de Ciencias y Laboratorio de Experimentación Animal por abrirme las puertas. A la sección genética y todos sus integrantes por permitirme ser parte.

A Federico Dajas, Fernanda Blasina y Lucia Vaamonde, importantes colaboradores de este trabajo, quienes aportaron el preparado nanosomal de quercetina.

A Analía Lima y Madelón Portela del Instituto Pasteur por sus colaboraciones en las técnicas de 2D-DIGE y espectrometría de masas.

A Marcela Martínez y Juan Andrés Abín por su colaboración con la determinación de biodisponibilidad de quercetina.

A Bruno Musetti y Leonor Thompson por su asesoramiento en la técnica de TBARS.

A Héctor Rodríguez y Guillermo García por sus imprescindibles tareas en el cuidado de los animales y mantenimiento del bioterio, sin las cuales este trabajo no sería posible.

A Vanessa Athaíde por el entrenamiento en las pruebas de memoria.

A Lucia López, Ileana Sosa, Vanessa Athaíde y Marcela Ferreño por prestarnos sus manos para reanimar a las crías

Un especial gracias a María José Zuluaga, parte fundamental de este trabajo. Gracias por todas las enseñanzas, la paciencia, y por el apoyo en las tardes eternas en el criostato y las madrugadas en el bioterio.

A Daniella Agrati por sus incontables e invaluable aportes a mi formación, y el infaltable apoyo moral.

A mis compañeros de laboratorio Lu, Ile, Vale, Nestor, Christian, Wilson y Vero por hacer más amenas las jornadas. A Santiago, Yanina, y Sebastián por el tiempo compartido entre experimento y experimento.

A Darío y Aldana, a Vir y Marce, a mis padres Rita y Roberto y a Andrés por todo el cariño y aguante.

Contenido

Resumen.....	7
Introducción	8
Asfixia perinatal.....	8
Mecanismos patogénicos de la asfixia	9
Respuesta adaptativa a la asfixia	10
La quercetina como estrategia neuroprotectora.....	12
Administración de la quercetina	14
La vía intranasal como posible vía de administración.....	15
Modelos animales para el estudio de asfixia perinatal.....	16
Antecedentes de nuestro grupo	17
Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Diseño metodológico	21
Materiales y métodos	23
1. Animales.....	23
2. Estudio de biodisponibilidad	23
3. Protocolo de asfixia perinatal	23
4. Administración de quercetina.....	24
5. Evaluación de parámetros moleculares y celulares.....	25
5.1. Determinación de especies reactivas del oxígeno	25
5.2. Estimación de peroxidación lipídica.....	26
5.3. Determinación de niveles de histona H2AXp por Western Blot	26
5.4. Evaluación de muerte celular.....	27
5.5. Estudio del perfil proteico.....	28
6. Evaluación de parámetros fisiológicos y comportamentales.....	30
6.1. Evaluación de la ganancia de peso.....	30
6.2. Pruebas comportamentales para evaluar el déficit neurológico	30
6.2.1. Pruebas de reflejos motores y locomoción.....	31
6.2.2. Pruebas de memoria	32
6.2.3. Pruebas de ansiedad experimental.....	33
6.3. Evaluación del peso de los hipocampos.....	34

7. Análisis Estadístico	34
Resultados	36
1. Biodisponibilidad de la quercetina administrada por distintas vías	36
2. Sobrevida tras el protocolo de asfixia perinatal y la administración de quercetina	36
3. Evaluación del daño y/o de la protección a nivel molecular.....	37
3.1. Determinación de especies reactivas del oxígeno	37
3.2. Estimación de nivel de peroxidación lipídica	38
3.3. Determinación de los niveles de H2AXp	39
3.4. Determinación de niveles de caspasa-3 activada como indicador de muerte celular por apoptosis	40
3.5. Estudio del perfil proteómico.....	41
4. Evaluación de evidencias de daño y/o de protección en parámetros fisiológicos y comportamentales	46
4.1. Ganancia de peso	46
4.2. Evaluación del déficit neurológico: Pruebas comportamentales.....	47
4.2.1. Pruebas motoras durante la infancia	47
4.2.2. Pruebas de memoria en la infancia, adolescencia y etapa adulta	51
4.2.3. Pruebas de ansiedad experimental durante la infancia, adolescencia y etapa adulta	53
4.3. Determinación del peso de hipocampo	57
Discusión	58
Biodisponibilidad cerebral de quercetina	58
Protocolo de asfixia perinatal y la sobrevida asociada	60
Efecto de la quercetina en la sobrevida	60
El rol del estrés oxidativo en el daño y/o en la protección	61
Apoptosis.....	63
Crecimiento y desarrollo neurológico	64
Alteraciones motoras	65
Alteraciones cognitivas	66
Alteraciones emocionales	68
Diferencias entre sexos	71
Evaluación de perfiles proteicos diferenciales.....	72
Conclusiones	81

Perspectivas	82
Bibliografía	84

Resumen

La asfixia perinatal, definida como la insuficiencia de oxígeno en el sistema circulatorio del feto o del neonato, es una de las tres principales causas de muerte en recién nacidos en el mundo y sus manifestaciones neurológicas son la causa más importante de daño cerebral y secuelas neurológicas en niños. La alta mortalidad y morbilidad de esta situación clínica, hace necesaria la búsqueda de estrategias neuroprotectoras. Actualmente el estándar de atención de los niños con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica es la hipotermia controlada. Sin embargo, este tratamiento es parcialmente efectivo, pudiéndose beneficiar del uso de terapias adjuntas para mejorar la protección. Además, terapias alternativas podrían ser beneficiosas en contextos de bajos recursos donde la hipotermia no es un procedimiento de rutina. En este sentido, hace algunos años se viene estudiando la capacidad neuroprotectora de la quercetina, el flavonoide más abundante en la naturaleza y en la dieta humana, conocida por exhibir numerosos efectos biológicos y farmacológicos gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas. Si bien existen evidencias de neuroprotección *in vivo* de este compuesto en diversos contextos patológicos, incluida la asfixia perinatal aún no se conocen completamente los mecanismos efectores de la quercetina. Es por ello, que nos propusimos evaluar la capacidad neuroprotectora de este compuesto cuando es vehiculizado en nanosomas en un modelo de asfixia perinatal en ratas, con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos de daño y de protección en este contexto. Encontramos que la quercetina alcanzó el cerebro y tuvo un impacto positivo en la supervivencia de los animales asfícticos, así como en algunos parámetros comportamentales tanto locomotores como cognitivos y emocionales. Mientras que en la evaluación de sus propiedades antioxidantes y antiapoptóticas encontramos efectos leves. No obstante, mediante un abordaje proteómico logramos identificar posibles blancos de acción del tratamiento con quercetina.

Introducción

Asfixia perinatal

La asfixia perinatal (AP) junto con las infecciones y la prematuridad, es una de las tres principales causas de muerte en recién nacidos en el mundo, representando el 23% de la mortalidad neonatal global (Kurinczuk, White-Koning, & Badawi, 2010; L. Liu et al., 2015).

Desde el punto de vista fisiológico se puede definir la asfixia como la insuficiencia de oxígeno en el sistema circulatorio del feto y del neonato, asociada a grados variables de hipercapnia y acidosis metabólica (Volpe et al. 2005). La incidencia de eventos de asfixia perinatal severa (causante de muerte o discapacidad neurológica severa) se estima que es de uno cada 1000 nacidos vivos en los países industrializados, aumentando a 5-10 cada 1000 nacidos vivos en países de bajos recursos (McGuire, 2007).

A nivel clínico, la Asociación Americana de Ginecología y Obstetricia y su par de Pediatría han definido la asfixia como un problema caracterizado por cuatro componentes, que deben estar todos presentes para poder diagnosticarlo: Acidosis metabólica en sangre de cordón ($\text{pH} < 7,00$), signos neurológicos en el período neonatal (hipotonía, convulsiones, coma, etc.), complicaciones sistémicas en diferentes órganos en el período neonatal, y puntaje de Apgar entre 0-3 después del quinto minuto (parámetro clínico que permite calificar la adaptación a la vida extrauterina). Si bien existe un compromiso sistémico, el sistema nervioso central es el más afectado, muy por encima de las alteraciones renales, pulmonares, cardíacas y gastrointestinales (Carbajal Ugarte & Pastrana Huanaco, 2002; Vinacur et al., 2000).

Clínicamente se conoce como encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) al síndrome neurológico que aparece en el recién nacido tras un episodio de asfixia perinatal. Se estima que la encefalopatía hipóxico-isquémica se presenta con una incidencia de 1,5 cada 1000 nacidos vivos (Kurinczuk et al., 2010). Aproximadamente entre el 10%-20% de los recién nacidos afectados muere en el período posnatal (cifra que alcanza el 60% en prematuros) y 30% queda con discapacidad neurológica (Martínez, Pouso, Borbonet, Bidegain, & Goldberg, 2005.; Shankaran, 2009). La asfixia perinatal y sus manifestaciones neurológicas son la causa más importante de daño cerebral y

secuelas neurológicas en niños (Azzopardi, 2010; James & Cherian, 2010; Martinez-Biarge, Diez-Sebastian, Rutherford, & Cowan, 2010). Estas alteraciones motoras y cognitivas, de gravedad variable, incluyen parálisis cerebral, convulsiones, espasticidad, déficit de atención, hiperactividad, retraso mental y otros síndromes neuropsiquiátricos de inicio tardío a nivel clínico (du Plessis & Volpe, 2002; Kaufman et al., 2003; Odd, Lewis, Whitelaw, & Gunnell, 2009; van Erp et al., 2002; S. J. Vannucci & Hagberg, 2004).

Mecanismos patogénicos de la asfixia

El daño cerebral debido a un evento hipóxico-isquémico transitorio perinatal es un evento que progresa gradualmente, que comienza con el insulto hipóxico-isquémico primario y se extiende a la etapa de recuperación luego de que la oxigenación y la perfusión fueron restauradas. Esta complejidad de eventos hace que la búsqueda de estrategias neuroprotectoras para esta patología deba considerar los diferentes aspectos moleculares, muchos de ellos aún no bien conocidos.

El proceso se inicia con la privación de glucosa y aporte de oxígeno, causando una falla energética primaria, donde los niveles de compuestos fosfato de alta energía disminuyen (Edwards et al., 2010). Esto desencadena la acumulación de ácido láctico, y la falla de las bombas Na^+/K^+ y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que conlleva al influjo de agua y sodio y finalmente al edema celular. Se da un aumento de la concentración de calcio citosólico, que inicia la liberación de aminoácidos excitatorios, como el glutamato, al espacio extracelular, el cual genera un influjo de calcio dando lugar a un ciclo excitotóxico (Pierson et al., 2007). Otras consecuencias son la generación de especies reactivas del oxígeno y de óxido nítrico y peroxidación de lípidos, conduciendo a injuria neuronal, neurodegeneración y muerte celular por apoptosis y necrosis. La necrosis es el tipo de muerte celular rápida y severa que ocurre con el insulto hipóxico-isquémico primario (Rainaldi & Perlman, 2016).

Luego de la resucitación, la perfusión y oxigenación cerebral son restauradas, junto con la restauración parcial de las fuentes de energía. A pesar de ello, hay una progresiva disminución de los fosfatos de alta energía subsecuente 24 a 48 horas después, que constituye la falla energética secundaria (Lou, Lassen, & Friis-Hansen, 1979). Durante esta falla energética secundaria, se da la llamada injuria de

reperusión, debido a reacciones extendidas que se originaron durante el insulto primario. Esta injuria se caracteriza por inflamación, generación de especies reactivas del oxígeno y radicales libres, y fundamentalmente muerte celular vía apoptosis (Pryds, 1991). La apoptosis puede ser inducida por procesos caspasa-dependientes o independientes (Pierson et al., 2007). La caspasa-3 es la caspasa efectora más abundante en el cerebro en desarrollo (Vesoulis, Liao, Trivedi, Ters, & Mathur, 2016) y hay una correlación directa entre la activación de caspasa-3 y el grado de injuria después del insulto hipóxico-isquémico (Haynes, Sleeper, Volpe, & Kinney, 2013). Debido a que son procesos que se dan con cierto retraso luego del insulto, la apoptosis se ha vuelto una diana terapéutica de interés en el contexto de las encefalopatías hipóxico-isquémicas (van Bel & Groenendaal, 2016).

Este patrón de daño cerebral bifásico en neonatos, genera una ventana “terapéutica”, desde el nacimiento hasta las 6 horas de vida, durante la cual, las estrategias neuroprotectoras pueden prevenir o reducir las consecuencias de este daño cerebral que se da más tardíamente (Hope et al., 1984; Iwata et al., 2008).

Respuesta adaptativa a la asfixia

La respuesta celular a la hipoxia implica la regulación coordinada de la expresión de un gran número de genes con funciones diversas. Como consecuencia del fallo energético primario, las células tratan de minimizar el daño al disminuir la demanda energética. Esta respuesta neuroprotectora determina una supresión de procesos no esenciales que consumen energía como la proliferación celular, la transcripción génica y la síntesis proteica (Hochachka & Lutz, 2001; White et al., 2000).

A largo plazo, se induce una segunda respuesta, que depende principalmente de la modulación de la expresión génica que pueden llevar a la célula a dos destinos alternativos, por un lado, si el grado de daño es irreparable se activan mecanismos de muerte celular, mientras que, de lo contrario, se da la activación de vías que promueven la supervivencia celular. En su conjunto, estos eventos a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional determinan el destino del tejido afectado (Van Elzen, Moens, & Dewilde, 2008).

Se ha evidenciado que miles de genes son influidos por exposición a la hipoxia (Sonna, Cullivan, Sheldon, Pratt, & Lilly, 2003; A Vengellur, Phillips, Hogenesch, &

LaPres, 2005; Ajith Vengellur, Woods, Ryan, Johnson, & LaPres, 2003). Los estudios a gran escala que analizan los cambios de expresión génica a nivel de transcriptoma y/o proteoma han llevado a la identificación de genes y familias génicas, que previamente no habían sido vinculadas a la patología hipóxico-isquémico (Van Elzen et al., 2008). Frente a esta realidad, resultan pertinentes los estudios de abordaje transcriptómico y proteómico con el fin de identificar nuevos marcadores o blancos terapéuticos.

Tratamiento del recién nacido con asfixia perinatal

El tratamiento del recién nacido con asfixia perinatal se ha limitado a los cuidados intensivos (oxigenación y ventilación, sostén de la tensión arterial y del estado normoglicémico) y al tratamiento de las convulsiones con fenobarbital (Shankaran, 2009).

Existen numerosos compuestos y tratamientos (como melatonina, alopurinol, xenón, eritropoyetina, células madre, entre otros) que están siendo evaluados en estudios clínicos y preclínicos, pero aún no están disponibles para su uso a nivel clínico (Glass, 2018).

Actualmente el estándar de atención de los niños con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica es la hipotermia controlada. Se emplea leve hipotermia con disminución de la temperatura corporal entre 1°C a 3°C (33-34°C) con una duración de 72 horas. Es la única recomendada hoy en día para su uso a nivel clínico en bebés nacidos después de las 36 semanas de gestación, con resultados beneficiosos y con una menor tasa de mortalidad asociada (Jacobs et al., 2013). Sin embargo, este tratamiento es parcialmente efectivo, dejando un 50% de los niños con resultados adversos (muerte o secuelas neurológicas) aún tras el tratamiento (Azzopardi, 2010). Este tratamiento se podría beneficiar del uso de terapias adjuntas para mejorar la protección y los resultados obtenidos. Además, terapias alternativas podrían ser beneficiosas en contextos de bajos recursos donde la hipotermia no es un procedimiento de rutina (Robertson et al., 2008).

La quercetina como estrategia neuroprotectora

La quercetina es un flavonol, cuya nomenclatura IUPAC es 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanona, y es el flavonoide más abundante en la naturaleza y en la dieta humana. La quercetina es conocida por exhibir numerosos efectos biológicos y farmacológicos gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas (E.-J. Lee, Ji, & Sung, 2010; Meyers, Rudolf, & Mitchell, 2008; Vargas & Burd, 2010). Se han estudiado múltiples aplicaciones farmacológicas para la quercetina, entre las que se incluyen: antioxidante neuroprotector, anti-viral, anti-cancerígeno, anti-microbiano (Nishimuro et al., 2015).

La actividad antioxidante intrínseca de la quercetina se ha atribuido a la eliminación directa de ROS, a través del "scavenging" o captado de electrones desapareados, o a la quelación de metales pesados que previene la generación de radicales hidroxilo a través de reacciones de tipo Fenton (reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno con metales de transición, generalmente hierro, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo). Estas propiedades son principalmente resultado de la estructura química de la quercetina, en particular de la presencia y ubicación de las sustituciones hidroxilo y el anillo catecol tipo B (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységú, 2011). La quercetina también es conocida por su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, previniendo el daño a las membranas celulares, al contribuir con un átomo de hidrógeno al radical tocoferil (Nam et al., 2016).

Históricamente se ha puesto mucho énfasis en las propiedades antioxidantes directas de la quercetina, pero dado que la capacidad antioxidante directa de la quercetina no es suficiente para explicar la multiplicidad de acciones que este compuesto presenta, cada vez más se maneja la noción de que hay otros mecanismos subyacentes, como la activación de vías de señalización y de modulación de la expresión génica. Por un lado, los niveles circulantes del flavonoide "per se" en el organismo no serían suficientes para contrarrestar de forma directa, a través de la actividad de la captación de electrones desapareados, desbalances en el estado redox celular (Spencer, 2009), lo que lleva a pensar que la quercetina activa otros efectores. Por otra parte, se ha especulado que la actividad antioxidante por sí sola no explica la bioactividad de los flavonoides *in vivo* (Kawabata, Mukai, & Ishisaka, 2015). Es probable que eliminar el exceso de radicales libres pueda restaurar el equilibrio

redox en el inicio del estrés oxidativo celular. Pero en insultos celulares masivos como la isquemia, que involucra falla metabólica, pérdida de la homeostasis del calcio y excitotoxicidad, la actividad "scavenger", es decir su capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres, puede no ser suficiente para proteger a las células del daño oxidativo.

De hecho, se ha comprobado que la quercetina también puede ejercer efectos moduladores sobre las vías de señalización celular. Así por ejemplo, los efectos antiinflamatorios de la quercetina están asociados a la inhibición de NF- κ B (K. W. Lee et al., 2008), mientras que su capacidad de prevenir el daño oxidativo se ha asociado a la activación de kinasas (MAPK, JNK y p38), de la vía PI3K/Akt (Weng, Chen, Yeh, & Yen, 2011) y de Nrf2 (Ji, Sheng, Zheng, Shi, & Wang, 2015). Afecta también numerosos blancos de vías de señalización vinculadas a la apoptosis (Kim et al., 2010). Dado el rol importante que juegan el estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular en los procesos de daño que la asfixia desencadena, las propiedades anti-apoptóticas, anti-inflamatorias y antioxidantes convierten a la quercetina en un buen candidato a evaluar como tratamiento protector en el contexto de la asfixia perinatal.

En este sentido, su actividad neuroprotectora se viene estudiando desde hace algunos años. Numerosas evidencias en neuronas en cultivo afirman una acción protectora de quercetina frente a diversas agresiones, principalmente oxidativas, como el peróxido de hidrógeno (Arredondo et al., 2004; Dajas et al., 2003), hidroperóxido de ácido linoleico (Sasaki, Toda, Kaneko, Baba, & Matsuo, 2003) e hidróxido de terbutilo (Silva, Gomes, & Coutinho, 2008), entre otros.

Las evidencias de neuroprotección *in vivo* han explorado diversos paradigmas en experimentos de trauma (Schültke, Kamencic, Skihar, Griebel, & Juurlink, 2010), neurotoxicidad por compuestos como plomo, metilmercurio y tungsteno (Barcelos et al., 2011; P. Hu et al., 2008; Sachdeva, Pant, Kushwaha, Bhargava, & Flora, 2015), hipoperfusión cerebral (Takizawa et al., 2003), hemorragia intracerebral (Y. Zhang et al., 2015), lesiones inducidas por radiación (Kale et al., 2018), enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Sabogal-Guáqueta et al., 2015; Wattanathorn et al., 2010) y Parkinson (Denny Joseph & Muralidhara, 2013, 2015; Lv et al., 2012). También se ha estudiado en el contexto de isquemia transitoria (Cho, Kim, Jang, Kim, & Lee, 2006) y permanente (Rivera, Urbanavicius, Gervaz, Morquio, & Dajas, 2004a),

e hipoxia hipobárica (P. Liu et al., 2015). Es importante notar que en muchos de estos estudios la administración de la quercetina se hace previamente al insulto, lo que es poco extrapolable al nivel clínico en un evento agudo que se da de forma inesperada. Más allá de sus propiedades antioxidantes y antiapoptóticas, los mecanismos subyacentes del efecto neuroprotector de la quercetina no han sido elucidados completamente.

En el contexto de asfixia perinatal, son pocos los estudios realizados hasta el momento. Qu y colaboradores demostraron en un modelo de injuria hipóxico-isquémica en la etapa neonatal que la quercetina mejora el déficit cognitivo a través de la promoción de la remielinización (Qu et al., 2014). Por otra parte, Blasina y colaboradores reportaron el efecto protector de la quercetina, vehiculizada en un nanosoma, en un modelo de asfixia perinatal en cerdos recién nacidos y demostraron que su administración intravenosa mejora la función cerebral (mediante el monitoreo de la función cerebral) y ayuda a estabilizar hemodinámicamente a los individuos (Blasina, Vaamonde, Silvera, Tedesco, & Dajas, 2015). Sin embargo, aún resta establecer los mecanismos de acción que subyacen a esa neuroprotección, complementarla con datos no solo fisiológicos y bioquímicos, sino también a nivel celular y molecular en el contexto de asfixia perinatal, los que han sido poco explorados *in vivo*.

Administración de la quercetina

El consumo oral de los compuestos flavonoides como la quercetina implica que deben pasar por el tracto gastrointestinal y el hígado y estar sujetos a numerosas alteraciones bacterianas y enzimáticas antes de alcanzar la distribución sistémica (Serafini, Peluso, & Raguzzini, 2010). La absorción, la cual se da a nivel del estómago y el intestino delgado, es muy baja de acuerdo con estudios farmacocinéticos, constituyendo un paso limitante de la biodisponibilidad (Goldberg, Yan, & Soleas, 2003). Además, la quercetina sufre una importante metabolización hepática (glucoronización, metilación, etc.) y una gran parte es eliminada rápidamente. Debido a ello los niveles circulantes del flavonoide libre son muy bajos (Bischoff, 2008). De hecho, se ha demostrado que los flavonoides tienen una baja biodisponibilidad cuando son administrados vía oral (de Boer et al., 2005; Kahle, Kraus, & Richling, 2005; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004;

Morand, Manach, Crespy, & Remesy, 2000) por lo que los efectos neuroprotectores de estos compuestos típicamente son examinados luego de la inyección intraperitoneal o intravenosa (Ossola, Kääriäinen, & Männistö, 2009).

A esto se le agrega el hecho que la naturaleza lipofílica de la quercetina dificulta su disolución en medios hidrosolubles para su acceso al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (Rivera et al., 2004a). Por ello, se hace necesario el desarrollo de un transportador que proteja a la molécula de la metabolización y facilite el acceso cerebral. El desarrollo de dicho transportador aparece como una exigencia clave para estudiar *in vivo* el efecto terapéutico. El carácter hidrofóbico de la quercetina la convierte en un candidato ideal para su encapsulación en nanopartículas de naturaleza lipídica. Este tipo de nanopartículas mejora la absorción aumentando la solubilidad aparente en agua. A su vez, gracias a su pequeño tamaño (20–200 nm) promueve la permeación tisular (Guo & Bruno, 2015).

En este sentido, se viene trabajando desde hace algunos años en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Clemente Estable. Se formularon liposomas conteniendo quercetina con lecitina, demostrándose experimentalmente la capacidad protectora cerebral de esta formulación en un modelo *in vivo* de isquemia en ratas (Rivera et al., 2008). Se ha ido modificando la formulación del liposoma hasta llegar a una formulación original en la forma de nanosoma, para vehiculizar la quercetina a partir de lecitina/colesterol/2-hidroxypropil-b-ciclodextrina, lo que incrementó notoriamente la solubilidad de quercetina y la estabilidad del transportador y lo han administrado exitosamente de forma intravenosa en cerdos demostrando la seguridad del preparado para administración sistémica, posibilitando una adecuada biodistribución, y permitiendo a la droga acceder al cerebro sin mayor metabolización (Blasina et al., 2015).

La vía intranasal como posible vía de administración

Los nanosomas pueden administrarse por vía parenteral, oral, nasal y tópica (C. Li et al., 2013; Mozafari et al., 2009; Shoji & Nakashima, 2004). En situaciones de emergencia la vía intravenosa suele ser la vía de preferencia por su rapidez en la absorción. Sin embargo, la vía intranasal es una de las rutas de administración que podría ser muy conveniente para la entrega de medicamentos. La alta absorción nasal de medicamentos se debe a la gran superficie de la mucosa y a la abundante

vascularización del epitelio. Por otra parte, la sangre que circula en el epitelio pasa directamente a la circulación sistémica evitando el primer paso de metabolismo hepático. Es una vía que presenta grandes ventajas, dado que es de muy fácil administración, por lo que es aplicable a cualquier nivel de atención. A su vez tiene un bajo índice de efectos secundarios y un alto nivel de aceptación en la población. Esta vía permite la incorporación directa del fármaco al torrente circulatorio, evitando el tránsito por el tracto gastrointestinal inferior, y al sistema portal que conlleva a una rápida instalación del efecto (latencia rápida) con buena tolerancia (Trujillo Gómez, Montoya Restrepo, & Bruera, 2005).

A pesar de estas ventajas, es una vía poco explorada. En particular, para la quercetina, Wattanathorn y colaboradores, reportaron neuroprotección por parte de la quercetina encapsulada en un nanosoma administrada intranasalmente en un modelo de enfermedad de Alzheimer (Wattanathorn et al., 2010). Sería de gran interés para la aplicación de la quercetina como neuroprotector, conocer si en otras patologías, la administración intranasal es igualmente efectiva.

Modelos animales para el estudio de asfixia perinatal

El desarrollo de nuevas estrategias de neuroprotección frente a los eventos hipóxico-isquémicos perinatales sería imposible sin el uso de modelos animales. Si bien existen varios modelos para el estudio de este tipo de injuria en animales tan diversos como el cerdo, el cordero, el conejo, el primate y los roedores, ninguno es capaz de replicar a la perfección la complejidad de los eventos hipóxicos-isquémicos que se dan en el humano neonato. Las ventajas y desventajas de cada uno de los modelos deben ser evaluadas por el investigador en cada caso.

Algunos de los animales no roedores más utilizados como modelo son el conejo, la oveja y el cerdo. Estas especies tienen la ventaja de tener una relación materia gris/materia blanca similar a la del humano, pero el costo en estos animales de gran tamaño limita severamente el número de sujetos a ensayar (Mallard & Vexler, 2015). Asimismo, la vida más larga de estos animales, y la falta de pruebas comportamentales estandarizadas, dificulta el estudio de las consecuencias funcionales luego de la asfixia (Barkhuizen et al., 2017).

Otro grupo de animales ampliamente utilizado en los modelos de encefalopatía hipóxico-isquémica son los roedores, rata y ratón. Los dos modelos más utilizados son el de ligación de la arteria carótida y el de inmersión. El primero de éstos, que combina la ligación de la carótida con la exposición a 8% O₂ y se realiza en animales de 7 días de edad postnatal (P7), presenta la ventaja de que el estado de maduración del cerebro de roedor a esta edad es similar al del feto humano al momento del nacimiento a término (R. C. Vannucci & Vannucci, 2005).

Por otro lado, el modelo de inmersión, propuesto en 1991 por Bjelke del Karolinska Institutet de Suecia (Bjelke, Andersson, Ogren, & Bolme, 1991), es altamente reproducible y de fácil implementación. En este modelo la asfixia tiene lugar en el momento del parto y reproduce los eventos observados en la asfixia global: acidosis sistémica, hipercapnia, e hipoxia. Tiene además la ventaja de que evita las interferencias de procedimientos quirúrgicos, e induce asfixia global que afecta al cerebro en su totalidad, lo que lo hace más adecuado para la realización de diversos estudios incluidos los comportamentales. Se le suele criticar por usar crías en el día de nacimiento y no en el día postnatal 7, argumentando que el cerebro de la rata recién nacida es inmaduro en comparación con el neonato humano, sin embargo, esta afirmación refiere principalmente al neocortex (Herrera et al., 2017).

La rata constituye un buen modelo para estudiar alteraciones de manifestación clínica tardía, dado que existen numerosas pruebas altamente estandarizadas y ampliamente utilizadas que evalúan diversas funciones neurológicas. En la rata, varios estudios han investigado los efectos conductuales asociados con la asfixia perinatal, abordando la función motora (Bjelke et al., 1991; Y Chen et al., 1995), comportamiento emocional (M. E. Dell'Anna, Calzolari, Molinari, Iuvone, & Calimici, 1991; Hoeger et al., 2000; Paola Morales et al., 2010; Venerosi, Cutuli, Chiarotti, & Calamandrei, 2006) y la memoria espacial (Boksa, Krishnamurthy, & Brooks, 1995; Hoeger et al., 2000; Hoeger, Engidawork, Stolzlechner, Bubna-Littitz, & Lubec, 2006; Iuvone, Geloso, & Dell'Anna, 1996; C. Fabian Loidl et al., 2000; Van de Berg et al., 2003).

Antecedentes de nuestro grupo

Desde hace varios años, mantenemos una colaboración con el equipo del Dr. Federico Dajas y con la Dra. Fernanda Blasina (Depto. Neuroquímica, IIBCE y Depto.

Neonatología, Facultad de Medicina). La Dra. Blasina y la Msc. Lucia Vaamonde, realizan el protocolo de asfixia perinatal en el modelo de cerdos recién nacidos, y son responsables de la producción del preparado nanosomal de quercetina y de sus ensayos preclínicos (Blasina et al., 2015). Nuestro laboratorio ha participado en este trabajo multidisciplinario estudiando, a nivel de ARN (PCR en tiempo real) y proteínas (western blot) los niveles de expresión de ciertos genes candidatos, buscando identificar el perfil de acción de este flavonoide y eventualmente encontrar genes marcadores del daño por hipoxia y de la recuperación con quercetina. De los tres genes estudiados hasta el momento -nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) y Heme oxygenase-1 (HO-1)- solo el último mostró cambios significativos en sus niveles de ARN (Figura 1; Cardozo, 2014).

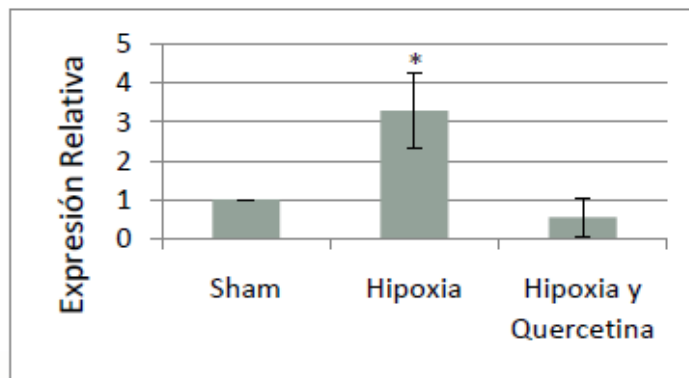


Figura 1. Expresión relativa del ARNm de HO-1 en corteza en las diferentes condiciones estudiadas relativas a la condición control: cerdos sham (control), cerdos sometidos a hipoxia, y cerdos sometidos a hipoxia y tratados con quercetina. *corresponde a $p < 0,05$ de acuerdo con el software REST.

Como hemos visto, las vías implicadas tanto en el daño como en la acción de la quercetina son diversas y muchos de los efectos son post transcripcionales y difíciles de detectar. Es por esta razón que nos propusimos emprender un abordaje proteómico para interrogar sin preconceptos al conjunto de proteínas e identificar aquellas que participan en este proceso. El análisis del perfil proteómico en cerdos recién nacidos demostró que varios de los cambios de expresión ocurridos con la hipoxia revierten con el tratamiento con quercetina. Las proteínas seleccionadas durante el análisis proteómico pudieron relacionarse con algunas vías indicando que éstas serían las principales implicadas en el daño y en las que la quercetina ejercería su acción restauradora (Figura 2). Estas son fundamentalmente el metabolismo

energético, la regulación del estado redox celular y el estrés oxidativo, y la apoptosis. La identificación de tales proteínas marcadoras *in vivo* permite profundizar en el vínculo entre los efectos protectores de los flavonoides y la alteración de la expresión génica lo que posibilita el estudio de blancos que puedan ser explotados en el desarrollo de nuevas terapias (Cardozo, 2014).

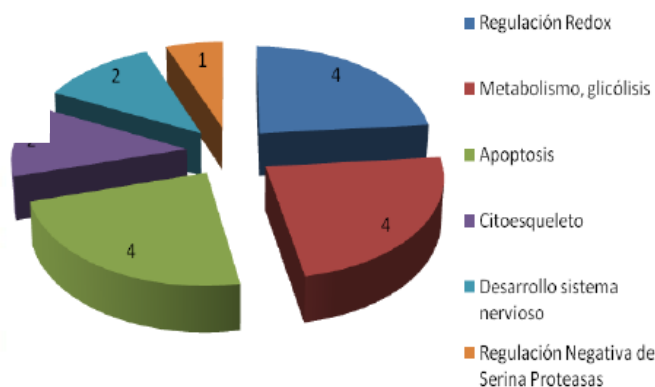


Figura 2. Resultados de estudio proteómico preliminar en modelo de asfixia en cerdos neonatos y tratamiento con quercetina a las 8 hs post asfixia. Se representan las funciones celulares más representadas en el grupo de proteínas identificadas que presentaron una expresión diferencial frente a la asfixia o al tratamiento con quercetina.

Este enfoque, en el modelo de cerdo, nos permitió identificar de forma preliminar las principales vías afectadas tras el daño inducido por hipoxia, así como por el tratamiento con la quercetina. A su vez, puso en evidencia el hecho de que el efecto neuroprotector de la quercetina determina cambios en el perfil proteico celular, y sus efectos no son únicamente resultado de su capacidad antioxidante directa. Si bien este abordaje permitió identificar potenciales candidatos, se requiere de más estudios para determinar con precisión la relación de las proteínas identificadas con el daño y/o la respuesta a la hipoxia y con el efecto neuroprotector de la quercetina. Además, sería beneficioso estudiar los cambios proteicos en respuesta a la hipoxia y a la quercetina a menores y mayores tiempos de sobrevivencia que profundizaran en los cambios moleculares de todas las etapas de esta compleja patología. De todas formas, un estudio de la dinámica temporal de los cambios, y sus confirmaciones, no podrían hacerse en el modelo del cerdo por ser un modelo muy costoso y que presenta ciertos problemas metodológicos. Sería útil volver a un modelo más sencillo, como el de la rata, que nos permite en cambio realizar numerosas pruebas a menor costo y a diferentes tiempos para ir siguiendo el curso temporal de los cambios tanto frente al daño como frente a los tratamientos.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es contribuir, mediante un modelo animal de asfixia perinatal, a la caracterización del daño en respuesta a la hipoxia en el Sistema Nervioso Central (SNC) y del efecto del flavonoide quercetina como neuroprotector en la etapa neonatal.

Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de la quercetina de acceder al cerebro, cuando es administrada como preparado lipo-nanosomal por las vías intraperitoneal e intranasal en ratas neonatas.
2. Estudiar posibles evidencias de daño oxidativo ocasionado por el protocolo de asfixia perinatal en el SNC y la posible neuroprotección de la administración de quercetina.
3. Determinar los niveles de muerte celular luego del evento asfíctico y tras el tratamiento con quercetina.
4. Identificar los cambios en el perfil proteico que se suceden en respuesta al evento asfíctico y en respuesta al tratamiento con quercetina.
5. Evaluar mediante pruebas comportamentales el efecto de la asfixia y del tratamiento con quercetina en este período, sobre parámetros fisiológicos, así como habilidades emocionales y cognitivas.

Diseño metodológico

El proyecto se propone utilizar el modelo de asfixia perinatal en ratas (Bjelke et al., 1991) con el fin de lograr una comprensión más sistemática de los mecanismos moleculares que subyacen al daño por hipoxia, específicamente la hipoxia severa durante el período perinatal en el SNC, y aportar datos acerca de los mecanismos de acción que subyacen a la neuroprotección mediada por un preparado de quercetina.

Para el cumplimiento del primer objetivo específico se utilizó animales control en el día postnatal 1 (P1), mientras que para los siguientes objetivos específicos se siguió el esquema experimental que se muestra en la Figura 3. Tras esperar el comienzo natural del parto y el nacimiento de la primera cría, se procedió a una cesárea seguida o no de protocolo de asfixia perinatal (según Bjelke et al. 1991 con algunas modificaciones) y posterior reanimación. Inmediatamente, tras el sexado, se les inyectó el preparado nanosomal cargado con quercetina o el vehículo vacío. Al finalizar esta etapa las crías se pusieron al cuidado de una madre subrogante hasta el momento de su utilización ya sea para pruebas moleculares o comportamentales.

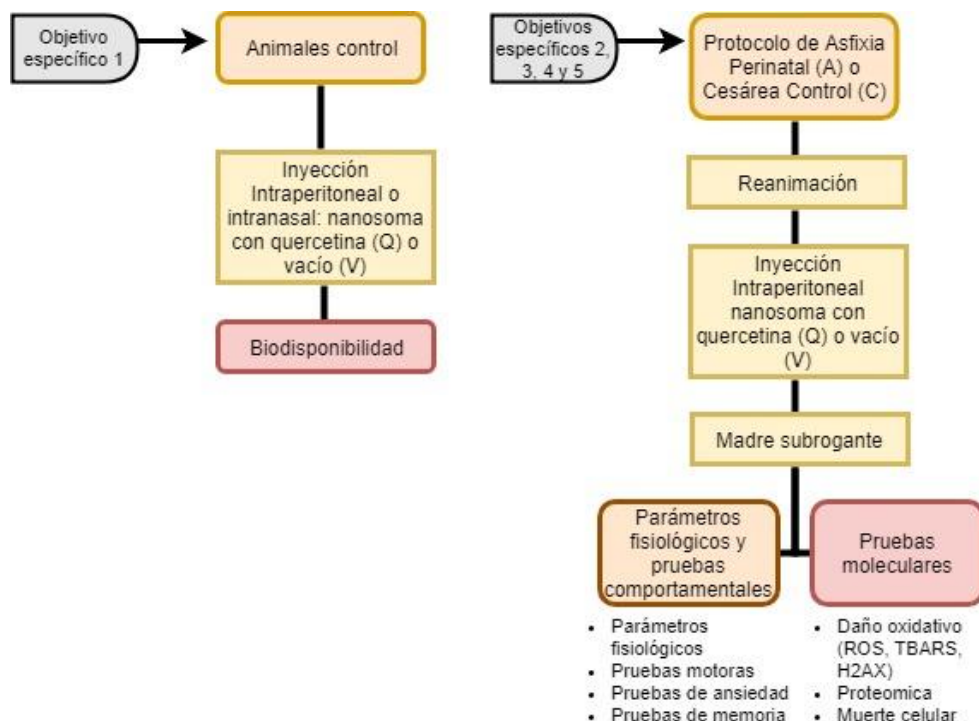


Figura 3. Esquema de la estrategia experimental desarrollada para el cumplimiento de los objetivos pautados.

Una vez reanimados e inyectados los animales, se conforman cuatro grupos experimentales que se usarán para el análisis y comparación, como sigue:

- 1) Control vehículo (CV): animales que nacen por cesárea a los que se les administró el vehículo (nanosomas vacíos) por vía intraperitoneal.
- 2) Control quercetina (CQ): animales que nacen por cesárea a los que se les administró quercetina vehiculizada en nanosomas por vía intraperitoneal.
- 3) Asfixia vehículo (AV): Animales sometidos a asfixia, a los que posteriormente se les administró vehículo.
- 4) Asfixia quercetina (AQ): Animales sometidos a asfixia, a los que posteriormente se les administró quercetina vehiculizada en nanosomas por vía intraperitoneal.

Materiales y métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) de ambos sexos, provenientes de camadas igualadas a 8 individuos (4 hembras y 4 machos) en el día del nacimiento (día 0). Los animales fueron alojados bajo temperatura y humedad controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 65%, respectivamente), en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y con alimento y agua ad libitum, en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias. Los protocolos experimentales de asfixia perinatal y las cesáreas control se llevaron a cabo en las mismas instalaciones, ajustándose a las disposiciones vigentes en la Ley N° 18611 y fueron aprobados por la CEUA de Facultad de Ciencias, expediente 240011-002308-14).

2. Estudio de biodisponibilidad

La determinación de la concentración de quercetina que alcanza el cerebro a lo largo del tiempo luego de su administración por vía intranasal o por vía intraperitoneal (biodisponibilidad), se realizó a tiempos 0, 15, 30, y 60 minutos luego de la administración por cualquiera de las vías (N variable para cada momento evaluado entre 2-5). Luego de la inyección, y a los tiempos indicados las crías fueron sacrificadas y se disecó el cerebro completo, y congelados a -20°C . Estas muestras fueron analizadas por la técnica de HPLC por detección electroquímica siguiendo un protocolo estándar con algunas modificaciones (Azuma, Ippoushi, Ito, Higashio, & Terao, 2002) en el Departamento de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

3. Protocolo de asfixia perinatal

El protocolo de asfixia perinatal en ratas está basado en el descrito por Bjelke et al, (1991) introduciendo algunos ajustes y modificaciones, tras el entrenamiento de miembros de nuestro grupo de investigación en el Laboratorio de Citoarquitectura e Injuria Neuronal con el Dr. Francisco Capani (Bs.As., Argentina). En la realización de la

cesárea y el protocolo de asfixia contamos con la colaboración de la Msc. Maria José Zuluaga de la Sección Fisiología y Nutrición de la Facultad de Ciencias.

De acuerdo a dicho protocolo, tras el nacimiento espontáneo de la primera cría (delivery), la madre fue sacrificada por decapitación y se le realizó una cesárea. Los cuernos uterinos fueron sumergidos en un baño de solución salina a 37 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las crías fueron reanimadas con estimulación cardíaca, oral y genital, y se ató el cordón umbilical (Figura 4). En nuestro caso se ensayaron diferentes tiempos (15-20 minutos), seleccionando el de 15 minutos, dado que por encima de este tiempo la mortalidad en nuestras condiciones experimentales fue del 100%.

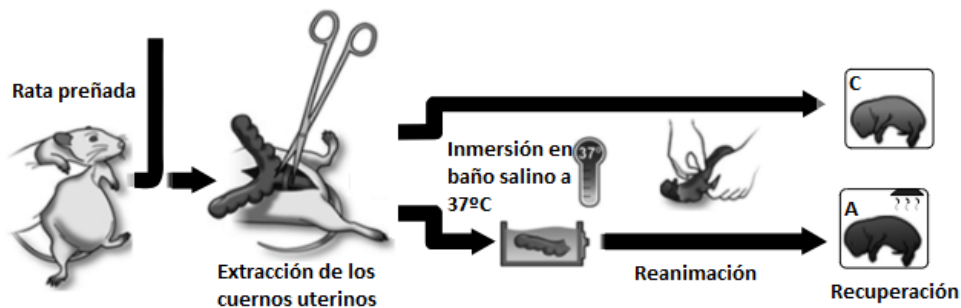


Figura 4. Protocolo de inducción de asfixia perinatal. Imagen adaptada de Galeano et al., 2012.

Los animales fueron sexados por examen de la distancia ano-genital el día del nacimiento tomado como día cero de vida postnatal (P0), y distribuidos al azar en alguno de los grupos experimentales. Se mantuvieron con madre subrogante hasta el momento de las pruebas.

4. Administración de quercetina

La quercetina en su preparación lipo-nanosomal fue proporcionada por el equipo de investigación del Dr. Dajas en la semana previa al ensayo. En todos los casos se utilizó una dosis de referencia de 10 mg/kg (Blasina et al., 2015) de una preparación con concentración de 2 mg/ml.

Para la evaluación de la biodisponibilidad la preparación fue administrada tanto por vía intranasal como intraperitoneal a animales control de 1 día de vida. Para administración intranasal se utilizó una jeringa Hamilton de 10 µl y una pequeña

cánula de polietileno (PE 10 de 0,28 mm diámetro interno, 0,64 mm diámetro externo) y se administró la dosis de a 2ul por vez cada 4 minutos, alternando narinas.

Para la evaluación de su capacidad protectora la preparación de quercetina (o el vehículo vacío) se administró tras asfixia o tras cesárea control, de una sola dosis en forma intraperitoneal exclusivamente. En este punto se optó por esta vía dada su sencillez, rapidez y para evitar una excesiva manipulación de animales que están muy debilitados luego del protocolo de asfixia.

5. Evaluación de parámetros moleculares y celulares

Para la evaluación de los distintos parámetros moleculares y/o celulares, como el estrés oxidativo, el nivel de apoptosis y la caracterización del perfil proteómico, se obtuvieron las muestras correspondientes a diferentes tiempos de acuerdo a información bibliográfica siguiendo la línea temporal que se muestra en la Figura 5.

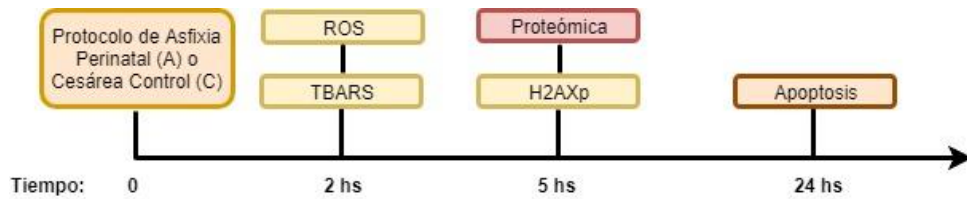


Figura 5. Línea temporal de obtención de muestras para las pruebas moleculares y/o celulares.

5.1. Determinación de especies reactivas del oxígeno

El nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS, por su nombre en inglés) fue estimado en muestras de corteza prefrontal de hembras de cada grupo experimental (N=4) a las 2 hs de la cesárea control o asociada a asfixia. Brevemente, el área de corteza prefrontal disecada se disgregó en PBS (10% p/v). La suspensión de células (10 mg/ml) fue cargada con la sonda permeante CM-H2DCFDA (5-(and-6)-clorometil-29,79-diclorodihidro-fluoresceinadiacetatoacetil éster) a una concentración final 20 μ M por 15 minutos. Este compuesto es convertido a su forma fluorescente dentro de la célula al reaccionar con radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y otros peróxidos de bajo peso molecular, por lo que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ROS presente en la célula. La

fluorescencia se midió en el espectrofluorómetro Cary Eclipse (Agilent Technologies) a 499 nm/520nm ex/em (Halliwell & Whiteman, 2004).

5.2. Estimación de peroxidación lipídica

Esta determinación se realizó por la técnica que emplea el ácido tiobarbitúrico (TBARS por Thiobarbituric reactive species), dado que uno de los principales productos de la peroxidación lipídica es el malonaldehído, el cual puede reaccionar y formar un aducto con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico para producir una especie de color rosa que puede ser medida mediante la intensidad de fluorescencia 530nm/550nm ex/em (Pryor, 1991). Este protocolo se realizó a los 120 minutos luego del comienzo de la asfixia, o de la cesárea control (N=3) en muestras de cerebro.

Se disgregó y homogeneizó el tejido (10%) en PBS (pH 7.2) frío con Butilhidroxitolueno (BHT) 0.025% p/v. A 150 μ l de cada muestra se le agregaron 300 μ l de solución TCA/TBA/HCl (ácido tricloroacético 15% p/v, ácido tiobarbitúrico 0.375% p/v, ácido hidrociorhídrico 0.25N) y 2.25 μ l de BHT 2.5% p/v. Se llevó a ebullición durante 15 minutos. Luego se lo dejó alcanzar temperatura ambiente y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos. Se leyó por duplicado en espectrofluorómetro Varioskan Flash (ThermoScientific) a 530/550 nm ex/em. En paralelo se realizó por duplicado la curva estándar de Malonaldehído (MDA). Los resultados se expresan en unidades de equivalentes de MDA por μ g de proteína. La cuantificación de proteínas se realizó por Qubit (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3. Determinación de niveles de histona H2AXp por Western Blot

Otra forma de evaluar el daño producido por el estrés oxidativo, es mediante la evaluación del daño generado sobre el ADN. Frente a un daño al ADN la variante de histona H2AX es fosforilada en la serina 139 (H2AXp), y es por ello considerada un marcador de daño al ADN (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998). Se utilizaron para este ensayo muestras de corteza, extraídas a las 5 horas del comienzo de la cesárea, de hembras de los grupos CV, AV y AQ. Se realizó la extracción proteica mediante homogeneización, de aproximadamente 50 mg de tejido en Urea Cracking Buffer (10mM) conteniendo PMSF (1mM), β -mercaptoetanol (1%) + cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich # catálogo P2714 (1%). Las proteínas extraídas se

almacenaron a -20°C hasta su utilización. Los extractos proteicos obtenidos fueron cuantificados con el reactivo de Bradford midiendo la absorbancia a 595 nm.

Las proteínas fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE) con un gel separador al 12%. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se realizó mediante electrotransferencia utilizando membrana de nitrocelulosa (Biorad) y la cuba de transferencia TE 22 Mini Tank Transfer Unit (GE Healthcare Life Sciences) durante 1h 45 min a 300mA y 100V. La membrana resultante fue bloqueada con TBS-leche descremada 5% (1 hora a temperatura ambiente). Los lavados se realizaron con TBS (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5) y TBS-Tween 20 (0,05%).

El anticuerpo primario utilizado fue anti-p-H2AX #LF-PA0025 (AbFrontier) en una dilución 1/2000. El anticuerpo secundario, anti-conejo IgG conjugado a HRP (peroxidasa de rabanito) A6154 (Sigma) se usó a una dilución 1/7000. Como control de carga se utilizó anti- β -Actina # A1978 (Sigma) 1/2000 utilizando como anticuerpo secundario anti-ratón IgG DAKO conjugado a HRP 1/7000. Las incubaciones con anticuerpos se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. El substrato utilizado fue Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen™). Las bandas fueron visualizadas por revelado en placa radiográfica de la señal luminiscente. La cuantificación se realizó con el programa Image J (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

5.4. Evaluación de muerte celular

El estudio de muerte celular se realizó mediante análisis de inmunofluorescencia indirecta. A las 24 horas del nacimiento, machos de los grupos CV, AV y AQ (N=5) fueron anestesiados y perfundidos con solución salina fosfatada 0,05 M (PBS; pH 7,5), seguida por 4% paraformaldehído en PBS. Los cerebros extraídos fueron fijados en paraformaldehído al 4% toda la noche, crioprottegidos por inmersiones sucesivas en sacarosa al 15 y 30% en PBS, y conservados a -80°C . Se realizaron criosecciones coronales de 14 μm sobre portaobjetos tratados con polilisina, localizando mediante atlas (Ramachandra & Subramanian, 2011) la región de interés. Dichas áreas fueron: Hipocampo, Tálamo, Corteza piriforme, y Amígdala. Para la confirmación del estado del tejido y la localización, un corte de cada serie fue sometido a tinción convencional con tionina.

Las células apoptóticas se evidenciaron mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo anti-caspasa 3 activada 1/1000 (#9661 Cell Signaling). Las imágenes obtenidas se observaron en microscopio Nikon Eclipse 80i con filtros para fluorescencia (DAPI, FITC y Rhodamina) y cámara digital Nikon DS5MC-U2. La cuantificación se realizó con el programa Image J (Schneider et al., 2012). Se calculó el porcentaje de células caspasa 3 positivas sobre el total de células (marcación con DAPI) de las regiones de Interés (ROI) del área seleccionada para su estudio. Se contó un promedio de 250 células/corte, a excepción de corteza piriforme donde se contó un promedio de 40 células/corte.

5.5. Estudio del perfil proteico

Se realizó un estudio proteómico mediante electroforesis 2D-DIGE (Electroforesis en gel diferencial bidimensional) de acuerdo a la instrucciones del fabricante GE Healthcare (Healthcare, 2005). Se realizó la extracción de proteínas de muestras de cerebro extraída 5 horas post asfixia o cesárea control, proveniente de 4 animales diferentes (réplicas biológicas N=4) para cada una de las condiciones: CV, AV y AQ. La extracción de proteínas se realizó a partir de aproximadamente 50mg de tejido en buffer de lisis (7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 5 mM MgAc pH 8.5, 1mM PMSF, 1% cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich #catálogo P2714). Las proteínas extraídas se conservaron a -80°C hasta su uso. Antes de comenzar la técnica de 2D-DIGE las proteínas se pasaron por el kit comercial GE Healthcare 2D Clean Up para eliminar impurezas. Esta técnica fue realizada con la colaboración de Analía Lima de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo.

Para realizar la cuantificación de proteínas en los extractos proteicos obtenidos se utilizó tanto la reacción de Bradford midiendo la absorbancia a 595 nm, así como la cuantificación por electroforesis utilizando marcadores apropiados. El pH óptimo para DIGE minimal dyes es 8,5, por lo que se ajustó el pH de las muestras con NaOH 50 mM y 100 mM.

Para el marcado de las muestras con las sondas fluorescentes CyDye™ DIGE Fluor, Minimal Labeling Kit GE Healthcare, #28-9345-30, primero se reconstituyeron estas sondas en dimetilformamida (DMF) a una concentración final de 1 nmol/μl. Luego se

procedió al marcaje de las muestras de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando 400 picomoles de sonda por cada 50 µg de proteína.

Se debe usar un estándar interno en cada gel, para lo cual se mezclaron 25 µg de cada una de las 12 muestras para generar 300 µg del estándar interno, el cual fue marcado con CyDye DIGE Fluor Cy2 minimal dye. Para el marcado de las muestras se tuvo en cuenta alternar la disposición de muestras de cada gel y las sondas. En cada gel se corrieron dos muestras marcadas con sondas diferentes, y un estándar interno (EI) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Disposición de muestras y marcado con sondas en cada gel

	Cy3	Cy 5	Cy 2
Gel 1	AV 2	AQ 3	EI
Gel 2	CV 2	AV 1	EI
Gel 3	AQ 1	CV 4	EI
Gel 4	CV 1	AQ 2	EI
Gel 5	AV 3	CV 3	EI
Gel 6	AQ 4	AV 4	EI

La corrida de la primera dimensión de la electroforesis bidimensional se realizó en tiras Immobiline DryStrip de GE Healthcare#17123501 con un rango de pH 3-10 no lineal y de 18 cm de largo. Se juntaron las muestras a correr en un mismo gel, con buffer de muestra 2x (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2% (w/v)).

Las tiras de gel se hidrataron en forma pasiva en buffer de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, Chaps 2% p/v) con IPG buffer 3-10 NL (2%) y DTT (20mM final) a temperatura ambiente en oscuridad en “manifold” overnight. Luego se procedió a realizar la corrida de Isoelectroenfoco en el sistema Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System (GE Healthcare), con las siguientes condiciones:

1. Step and Hold 500 1:00 0.5vh
2. Gradient* 1000 1:00 0.8 vh
3. Gradient 8000 3:00 13.5vh
4. Step and Hold 8000 1:30–2:40 12.2–21.2vh

Total 7:30

Posteriormente, se procedió a la equilibración de las tiras de gel por 15 minutos en Buffer de equilibración 1 (Tris pH 8.8 75 mM, Urea 6 M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% (w/v), DTT 0.5% (w/v)), y luego en Buffer de equilibración 2 (Tris pH 8.8 75 mM, Urea

6 M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% (w/v), Iodoacetamida 4.5% (w/v)). La corrida electroforética de la segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5%, utilizando el sistema Ettan DALT six (GE Healthcare Life Sciences) y vidrios de baja fluorescencia. Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

1. 45 min 2 W/gel a 20°C
2. 4 h 17 W/gel a 20°C

Los geles fueron escaneados en el escáner Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare Life Sciences) y las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software específico DeCyder 2D (GE Healthcare). Utilizando este software se seleccionaron los “spots” que se expresaron diferencialmente en al menos una de las tres condiciones ensayadas, y cuya variación en la expresión fue significativa ($p < 0,05$ en prueba t-student).

Se procedió luego a la identificación de las proteínas por mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF, incluyendo los MS/MS, la cual fue realizado por Madelón Portela en el servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.

6. Evaluación de parámetros fisiológicos y comportamentales

6.1. Evaluación de la ganancia de peso

Los animales experimentales fueron monitoreados hasta el día postnatal (P) 70, y fueron pesados en los días P1, P3, P6, P8, P11, P13, P40 y P60. Se calculó el porcentaje de peso aumentado con respecto a P1, dado que las diferencias de peso al nacer entre individuos de distintas camadas varían considerablemente y generalmente se mantienen durante la vida del individuo.

6.2. Pruebas comportamentales para evaluar el déficit neurológico

Las pruebas comportamentales realizadas en el transcurso de este proyecto se realizaron en el Laboratorio de Experimentación Animal (L.E.A.) de Facultad de Ciencias con la colaboración de la Msc. Maria José Zuluaga y la Dra. Daniella Agrati. A continuación, se describe el cronograma seguido para la realización de estas pruebas

(Tabla 2). Hasta el día del destete (P21) se trabajó con machos (controles N=11, asfícticos N=9) y hembras (N=8 tanto controles como asfícticas), mientras que posterior al destete se trabajó únicamente con machos para sortear la variabilidad que agrega la ciclicidad ovárica de las hembras.

Tabla 2. Cronograma de ejecución de pruebas comportamentales.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P13	P14	P40	P60
Enderezamiento (Righting)			X			X		X							
Desplazamiento (Gait)									X						
Geotaxis													X		
Memoria olfativa											X				
Potenciación materna												X			
Reconocimiento objeto														X	X
Campo abierto														X	X

6.2.1. Pruebas de reflejos motores y locomoción

Las crías de rata son altriciales, es decir nacen con un grado escaso de desarrollo. Durante los primeros diez días de vida postnatal maduran el sistema vestibular, las vías descendentes y la regulación del reflejo postural, entre otros. Este tipo de reflejos y actividad locomotora pueden ser evaluadas mediante pruebas sencillas de realizar en ratas neonatas (Fox, 1965).

6.2.1.1. Reflejo de enderezamiento

En esta prueba los individuos se colocaron en posición supina (boca arriba) y fueron inmovilizados sosteniéndolos entre el pulgar y el dedo índice. Tan pronto como la cría dejó de moverse, se retiró la mano y se registró la latencia de la respuesta de enderezamiento. La prueba se consideró terminada cuando se logró el enderezamiento (es decir cuando el animal queda en posición prona con los cuatro miembros apoyados correctamente sobre la superficie) o después de 2 minutos. Se realizaron 3 pruebas espaciadas por 5 min (Morgan, Tulbert, & Ronca, 2012).

6.2.1.2. Gait o desplazamiento

Para la evaluación de la capacidad de desplazamiento espontáneo por parte de las crías, cada animal fue colocado en el centro de un círculo de 13 cm de diámetro, y se

observó si era capaz de moverse fuera del círculo en 30 segundos o menos. En los casos en que el animal logró salir del círculo se registró la latencia. En los casos en los que no lo logró se le adjudicó una latencia de 30 segundos (P. Kiss et al., 2005).

6.2.1.3. Geotaxis negativa

Para esta prueba el animal se colocó en el centro de una rampa inclinada (45°) de 30 cm de largo con la cabeza orientada hacia el suelo. Se registró si el animal fue capaz de darse vuelta y subir hasta el final de la rampa en 30 segundos. En los casos en que el animal logró esta tarea, se registró el tiempo en segundos para alcanzar el extremo superior de la tabla, y cuando no lo logró se le adjudicó una latencia de 30 segundos (P. Kiss et al., 2005).

6.2.2. Pruebas de memoria

6.2.2.1. Prueba de memoria olfativa

La identificación de la madre es crítica para la supervivencia y el desarrollo de los mamíferos, y las ratas neonatas aprenden rápidamente a identificar el olor de su madre y orientarse. Para evaluar esta capacidad, se utilizó la prueba de memoria olfativa (Raineke et al., 2009). A la edad postnatal P11 cada cría se colocó en una caja donde se distinguen dos áreas: una con viruta proveniente del nido materno (olor familiar) y en la otra viruta limpia (olor neutro). Las crías se colocaron en una sección libre de estímulos olfativos de la caja y se las dejó explorar por un período de 60 segundos. Se registró el tiempo de permanencia en la viruta limpia, en la viruta proveniente del nido y en el espacio neutro. Cada sesión constó de cinco pruebas espaciadas por 30 segundos. Los estímulos olfativos se cambiaron de lugar entre las pruebas. Se calculó el índice de preferencia como el tiempo que explora la viruta proveniente de nido sobre la suma de tiempos que explora la viruta de nido y la viruta limpia, por lo que un índice mayor a 0,5 indica preferencia por la viruta de nido. Otro criterio utilizado fue el cálculo de individuos que mostraron preferencia. Para ello, para categorizar a los animales en las categorías “prefiere” o “no prefiere” se consideró que el animal mostró preferencia si pasó al menos un 25% de tiempo adicional en la viruta de nido respecto de la viruta limpia.

6.2.2.2. Reconocimiento de objeto novedoso

Esta prueba es utilizada para evaluar procesos de aprendizaje y memoria. La misma consistió de una sesión de habituación en la caja de prueba de 5 minutos. Al día siguiente, durante la sesión de entrenamiento, se colocaron dos objetos idénticos en el campo abierto y se registró el tiempo que el animal exploró los mismos durante 2 minutos. Durante las sesiones de evaluación de retención de memoria de corta duración (realizada 90 minutos después del entrenamiento) y de memoria de larga duración (24 horas después), se colocó a cada animal en la misma caja donde uno de los objetos familiares fue sustituido por uno nuevo y se registró la exploración de los mismos durante un período de 5 minutos. El índice de reconocimiento se calculó como el tiempo de exploración del objeto nuevo sobre el tiempo total de exploración de ambos objetos y fue utilizado como una medida de memoria de reconocimiento (De Lima et al., 2005). Durante el entrenamiento es esperable obtener índices de reconocimiento de 0,5 porque el animal va a tender a explorar a ambos objetos por tiempos iguales. Al introducir un objeto nuevo en las pruebas de corta y/o larga duración, es de esperar que los animales recuerden el objeto conocido, y por tanto dediquen mayor tiempo a explorar el objeto novedoso. En este último caso el índice de reconocimiento será mayor a 0,5.

6.2.3. Pruebas de ansiedad experimental

6.2.3.1. Prueba de potenciación maternal

Esta prueba evalúa la respuesta de distrés ante la separación de las crías. En el día del experimento, la madre se retiró de la jaula y la camada se dejó en su nido sin perturbar durante 20 minutos. Se aisló a una cría durante 3 minutos en una caja de polipropileno y se registró el número de ultravocalizaciones (USV) que emitieron las crías, así como el número de cruces, posturas erguidas, acicalamiento y pivót (movimientos locomotores circulares). Luego, la cría fue introducida en la caja de la madre, y se registraron los cuidados maternos (acarreo, lamidos, olfateos, y tiempo de contacto) por un período de 5 minutos. Al finalizar este período de interacción madre-cría se volvió a aislar a la cría durante 3 minutos y se registraron los mismos parámetros que en el primer aislamiento. Es de esperar que la interacción con la madre potencie la respuesta de la cría al aislamiento, aumentando el número de ultravocalizaciones en el segundo aislamiento (Groenink et al., 2008).

6.2.3.2. Campo abierto

Esta prueba se emplea para evaluar ansiedad experimental y consistió en colocar al animal en una caja de campo abierto (100 x 100 cm, piso dividido en 12 cuadrantes iguales) y registró durante 10 minutos la latencia de entrada al área central del campo abierto, así como el número de cruces y el tiempo de permanencia en la periferia y en el centro. A su vez, se registró el número de posturas erguidas, acicalamientos y fecas. Tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en la parte central se consideran índices de ansiedad experimental (Hall, 1932).

6.3. Evaluación del peso de los hipocampos

A los 70 días de vida los animales macho fueron sacrificados, se disecó cuidadosamente el hipocampo y se pesó una de las partes en balanza analítica de precisión.

7. Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto de la condición (cesárea o asfixia, grupos independientes) y del tratamiento (vehículo o quercetina, grupos dependientes) sobre las variables moleculares y fisiológicas se utilizaron test paramétricos (Field, 2013). Para el análisis estadístico de los datos de peso corporal y de hipocampo, se utilizó el un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía de medidas repetidas. Para el peso de hipocampo se utilizó el test post-hoc de Bonferroni. En el caso de la determinación de ROS los grupos a comparar fueron independientes y se realizó un ANOVA de una vía, así como para la biodisponibilidad por vía intraperitoneal. En el caso de la biodisponibilidad el test post-hoc utilizado fue el test Tukey HSD. En el caso de la técnica de DIGE, los datos fueron analizados mediante test t de Student debido a que nos interesaba la comparación de a pares, y con el objetivo de simplificar la discusión posterior (Field, 2013).

Debido a que las variables comportamentales no presentaron en su mayoría distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (prueba Levene), fueron analizadas mediante pruebas no paramétricas (Siegel, 1956). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar el efecto de la condición cesárea o asfixia (grupos independientes, CV vs AV y CQ vs AQ), y la prueba pareada de

Wilcoxon para la comparación de los grupos vehículo y quercetina (grupos dependientes, CV vs CQ y AV vs AQ). A su vez, se utilizó la prueba pareada de Wilcoxon para comparar entre el entrenamiento y la prueba para cada grupo en la prueba de reconocimiento de objeto, y entre el 1er y 2do aislamiento para cada grupo en prueba de potenciación maternal.

Resultados

1. Biodisponibilidad de la quercetina administrada por distintas vías

Los datos obtenidos del ensayo de biodisponibilidad demostraron que la quercetina vehiculizada en el transportador lipídico nanosomal utilizado en este proyecto alcanza el tejido cerebral cuando es administrado tanto por vía intraperitoneal como por vía intranasal. Por vía intraperitoneal se analizó a tiempo 0, 15, y 30 minutos y los resultados se muestran en la Figura 6. La quercetina fue detectada a los 15 y a los 30 minutos (ANOVA de 1 vía: $F_{(2,10)}=8,98$ $p<0,05$, Post hoc: Tukey $p<0,05$ entre tiempo 0 y 15, y entre tiempos 15 y 30). No se detectó quercetina a tiempo 0, ni en animales control sin administración de quercetina.

Por vía intranasal la quercetina es detectable a tiempos 15, 30 y 60 minutos luego de su administración (Figura 6). No se realizó el análisis estadístico en este caso debido a que en tiempos 15 y 60 se utilizó $N=2$.

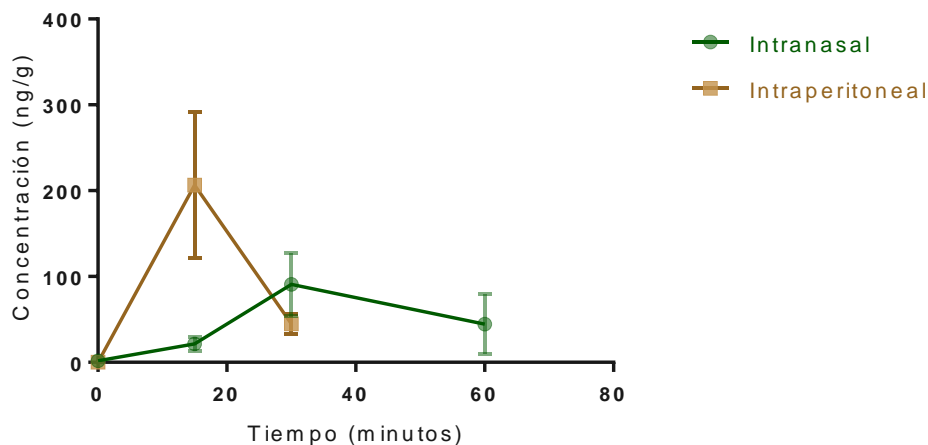


Figura 6. Determinación por HPLC con detector electroquímico de la biodisponibilidad cerebral por vía intraperitoneal evaluada a tiempo 0, 15, y 30 minutos e intranasal evaluada a tiempo 0, 15, 30 y 60. Los datos se presentan con la media y el error estándar de la concentración de quercetina en ng/g de tejido.

2. Sobrevida tras el protocolo de asfisia perinatal y la administración de quercetina

Para poder modelar el estado del neonato que, en el momento del parto, atraviesa una situación de privación de oxígeno, se ensayó un protocolo de asfisia

perinatal. En suma, para este tiempo de inmersión, se realizaron 18 protocolos de asfixia perinatal y 12 cesáreas control.

Al tiempo 0 observamos que luego de la asfixia de 15 minutos seguida de intento de reanimación, el $58 \pm 7\%$ (media \pm error estándar) de los animales sobrevivió, mientras que el 100% de los animales control sobrevivió a la cesárea (prueba estadística U de Mann-Whitney, $U_{(12,18)} = 12,0$, $p < 0,05$), indicando que el protocolo ensayado constituyó una injuria aguda severa. En 12 de los 18 ensayos de asfixia, se sexaron las crías que no sobrevivieron, y se observó que la mortalidad tras la asfixia fue similar en machos ($36 \pm 8\%$) y en hembras ($39 \pm 9\%$) (Prueba pareada de Wilcoxon $T_{(9)} = 18$, $p = NS$).

A los animales que sobrevivieron al evento asfíctico inicial (58 %) y a la cesárea en el caso de los grupos control (100%), se les administró por vía intraperitoneal el preparado nanosomal vacío (V) o con quercetina (Q). Las crías que inicialmente se logran reanimar no están fuera de peligro, sino que en las horas que siguen a la asfixia las crías que fueron reanimadas pueden morir. Por lo que, a las 24 horas luego de la administración del preparado se evaluó la sobrevida de los animales inyectados con preparado vacío o con quercetina. Encontramos que para los grupos control la sobrevida fue cercana al 100% (ya que para el grupo control CQ no hubo animales que no sobrevivieron a la cesárea y para el grupo CV solo 2/49 no sobrevivieron). En los grupos asfícticos, en cambio, la sobrevida disminuyó: en el grupo de los animales sometidos a asfixia e inyectados con vehículo (AV) 15/48 de los individuos no alcanzó las 24 hs de sobrevida, mientras que en el grupo inyectado con quercetina (AQ) fueron 8/50 los que no sobrevivieron 24 hs.

3. Evaluación del daño y/o de la protección a nivel molecular

3.1. Determinación de especies reactivas del oxígeno

Para evaluar si la asfixia y/o el tratamiento con quercetina afectan el estado redox del tejido cerebral estimamos la generación de especies reactivas del oxígeno midiendo la emisión de fluorescencia mediante el uso de la sonda DCFDA. Observamos que los grupos asfícticos tienden a tener una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a los controles, indicando por tanto una tendencia a mayor nivel de ROS (C vs A: ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,6)} = 3,3$ $p = 0.1$; Figura 7).

No se encontraron evidencias de que la quercetina pudiera restituir valores similares a los controles (Figura 7).

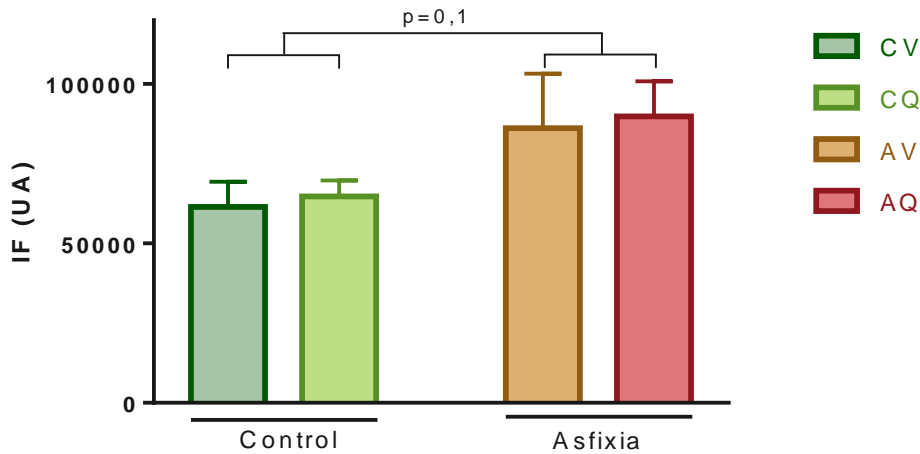


Figura 7. Determinación de especies reactivas del oxígeno. Los datos se presentan como media \pm ES de la intensidad de fluorescencia (IF) expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA). En el análisis estadístico el ANOVA de medidas repetidas $p=0.1$ en comparación C vs A. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

3.2. Estimación de nivel de peroxidación lipídica

Las especies reactivas del oxígeno tienen vidas medias muy cortas, lo que puede dificultar medirlas directamente. En vez de ello, se pueden medir productos del daño producido por el estrés oxidativo. Un ejemplo es la medida indirecta de la peroxidación lipídica a través de la determinación de las especies reactivas con ácido tiobarbitúrico. Se realizó un ensayo preliminar para evaluar este parámetro. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Se encontró que en los animales sometidos a asfixia e inyectados con vehículo hay una tendencia a un mayor nivel de equivalentes de MDA, y por tanto mayor nivel de peroxidación lipídica, mientras que en los animales tratados con quercetina luego de la asfixia el valor de equivalentes de MDA es comparable al del control o incluso menor, si bien estos datos no fueron estadísticamente significativos (ANOVA $F_{(2,7)}=0,58$ $p=NS$).

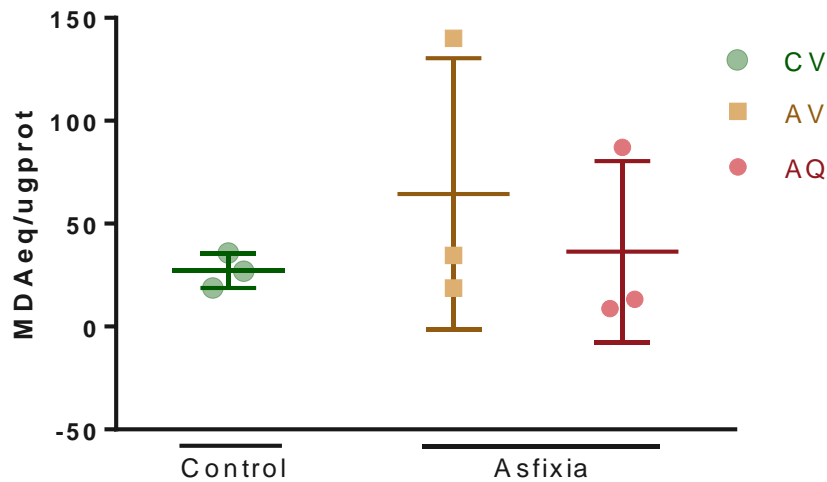


Figura 8. Determinación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico. Se presenta la distribución de los valores obtenidos en función de equivalentes de MDA (pmol/ug de proteína) como media y desvío estándar. CV: control vehículo, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

3.3. Determinación de los niveles de H2AXp

Para evaluar si los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX (H2AXp) se ven alterados tras la asfixia, o tras el tratamiento con quercetina, utilizamos la técnica de Western Blot. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de la forma fosforilada de dicha histona (AV vs AQ: Test t de Student $t_{(4)} = 0,93$ p=NS; Figura 9).

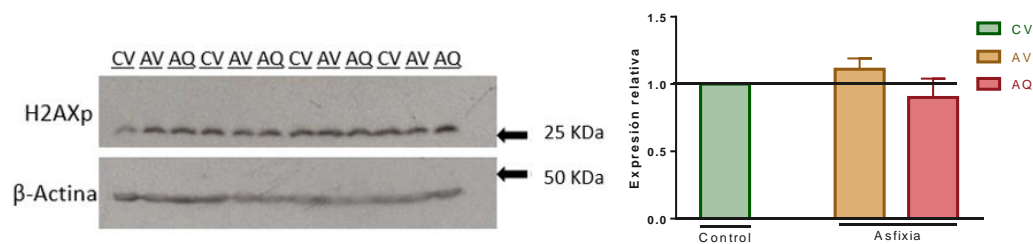


Figura 9. Determinación de niveles de H2AX fosforilada (H2AXp) mediante Western Blot. Se utilizó β -actina como control de carga. A la izquierda se muestran los resultados obtenidos en el Western Blot, y a la derecha la representación gráfica de la expresión, relativa al control (CV), y normalizada por β -actina expresada como media y error estándar. CV: control vehículo, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

3.4. Determinación de niveles de caspasa-3 activada como indicador de muerte celular por apoptosis

Para evaluar el nivel de muerte celular por apoptosis se realizó una inmunofluorescencia indirecta para la detección de caspasa 3 clivada. Se encontró un leve aumento del porcentaje de células con marcación para caspasa 3 clivada en el grupo sometido a asfixia e inyectado con vehículo, y una disminución con el tratamiento con quercetina de los animales asfícticos, en todas las áreas estudiadas (Figura 10). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas (ANOVA de una vía: Tálamo $F_{(2,10)}=0,94$ p=NS; Amígdala $F_{(2,11)}=0,47$ p=NS; Hipocampo $F_{(2,12)}=0,48$ p=NS; Piriforme $F_{(2,11)}=0,46$ p=NS).

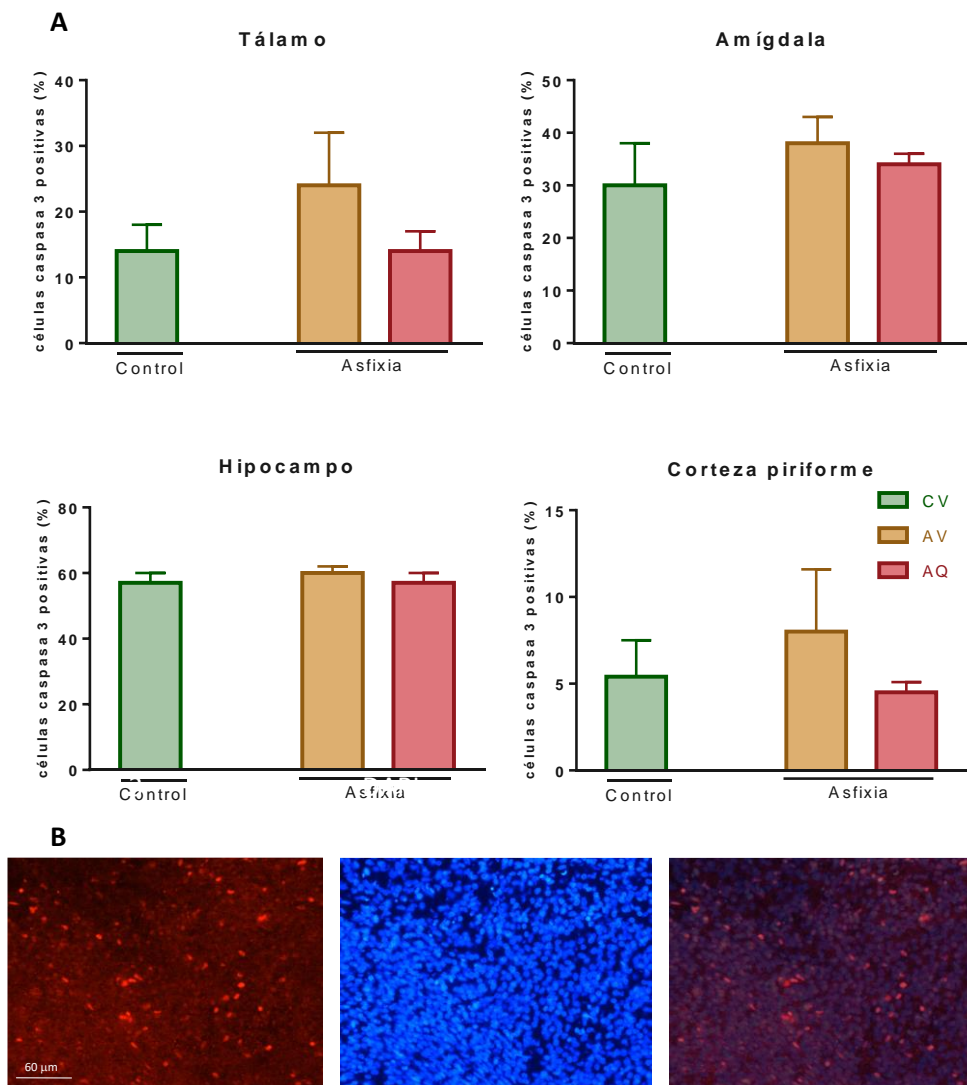


Figura 10. Determinación de niveles de caspasa 3 clivada en tálamo, amígdala, hipocampo y corteza piriforme. A) Se presenta la media y error estándar del porcentaje de células con señal caspasa 3 clivada respecto del total de células en las áreas seleccionadas para el conteo. B) Ejemplos de las imágenes obtenidas para un animal control, área tálamo. CV: control vehículo, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

3.5. Estudio del perfil proteómico

Para poder evaluar el efecto de la asfixia y del tratamiento con quercetina sobre la expresión génica utilizamos un abordaje proteómico, mediante electroforesis diferencial en gel y posterior análisis de los spots seleccionados por espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF-MS) para su identificación (Figura 11). Utilizando el software Decyder2D se seleccionaron 91 spots que se expresan diferencialmente ($p < 0,05$ en prueba t de Student). De estos se seleccionaron manualmente aquellos spots con mayor variación en su expresión, obteniendo así una selección de 42 spots que fueron enviados para su análisis por espectrometría de masas.

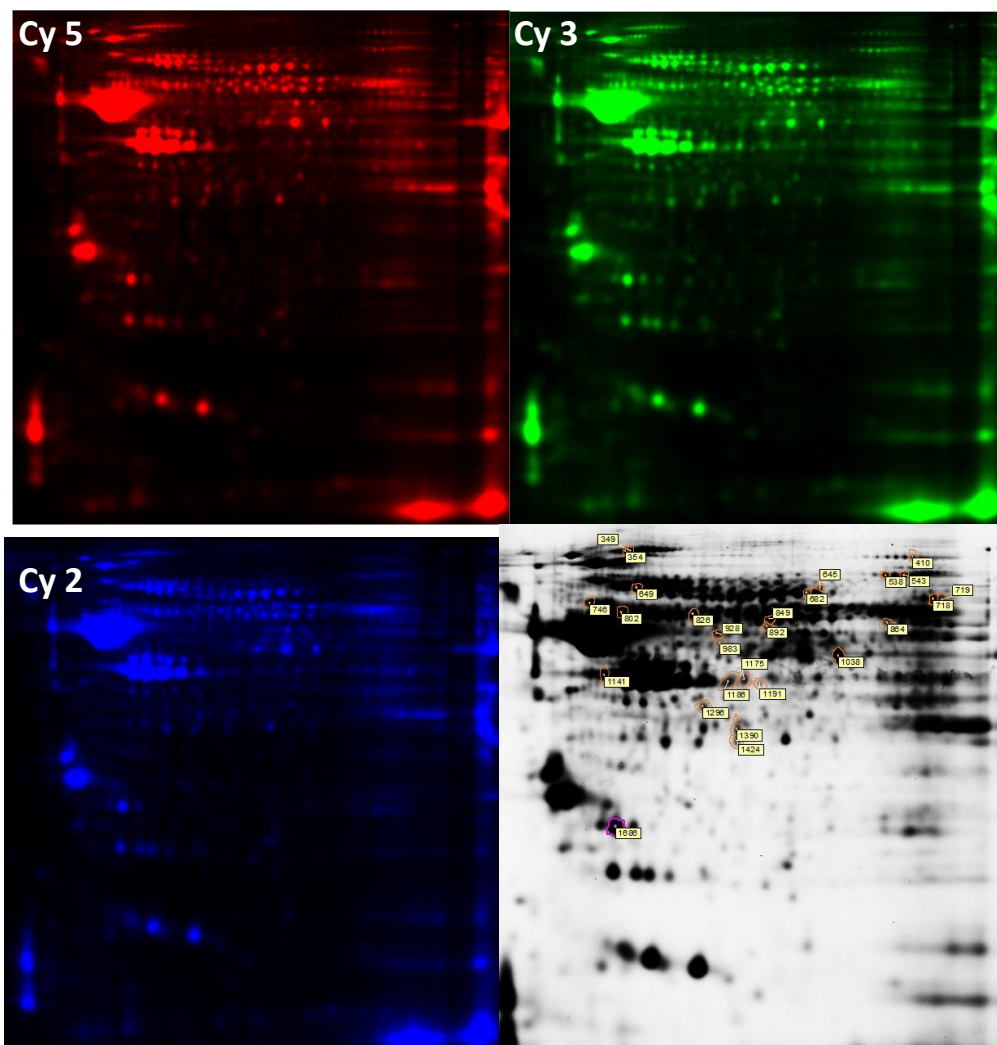


Figura 11. Imagen de master gel 2D DIGE escaneado a diferentes longitudes de onda para cada fluoróforo Cy3, Cy5 y Cy2. En la imagen inferior derecha en naranja se señalan se señalan los spots identificados utilizados para análisis.

Se lograron identificar 26 proteínas diferentes, aunque algunas de ellas se encontraron en más de un spot (Tabla 3). En el caso de los spots 826, 1191, 1424 se detectaron dos proteínas diferentes en cada spot, por lo que no se tuvieron en cuenta para los análisis posteriores, ya que no podemos discriminar cuál de las dos proteínas está expresada diferencialmente. Dichas proteínas son: T-complex protein 1 subunit epsilon, tubulin beta-3 chain, nucleophosmin, serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform y G protein beta 1 subunit. Las restantes proteínas identificadas, utilizadas para los análisis posteriores, se enumeran en la Tabla 3 y se muestran en la Figura 11.

Tabla 3. Proteínas identificadas por MALDI-TOF-TOF-MS.

Nº Spot	Proteína	Nombre abrev.	Nº Acceso	Ratio CV vs AV	Ratio CV vs AQ	Ratio AV vs AQ
349	heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	NP_705893	-1,09	-1,12 *	-1,02
354	heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	NP_705893	-1,14*	-1,1 (p=0,06)	-1,03
410	elongation factor 2	Eef2	NP_058941	-1,39*	-1,14	1,22
538	serotransferrin	Tf	NP_001013128	1,29*	1,23	-1,06
543	serotransferrin	Tf	NP_001013128	-1,18	1,09	1,28
645	dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	XP_006252159	-1,15	1,06	1,22*
649	heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8 - ENSRNOG 00000032585	NP_077327	1,18*	1,09	-1,08
682	Serum albumin	Alb	P02770	-1,02	1,44*	1,47 (p=0,06)
718	transketolase, isoform CRA_c	Tkt	EDL88993	-1,33*	-1,13	1,17
719	transketolase, isoform CRA_c	Tkt	EDL88993	-1,31*	-1,27*	1,03
746	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	XP_007648156	-1,02	-1,21*	-1,19*
802	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrnpk	XP_016835931	-1,09	1,16 (p=0,06)	1,26*
849	dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	NP_001004078	1,31*	1,31	1
864	pyruvate kinase PKM	Pkm	NP_037066	1,13*	1,06	-1,07
892	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform, isoform CRA_a	Ppp3ca	XP_006243252	-1,03	1,09*	1,13 (p=0,06)
928	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Atp6v1b2	NP_476561.1	-1,22*	-1,15	1,06
983	Tubulin, alpha 1A	Tuba1b	AAH62238.1	-1,3*	-1,58*	-1,21 (p=0,09)
1038	alpha-enolase isoform X1	Eno1	XP_006239506.1	-1,12*	-1,03	1,09
1141	POTE ankyrin domain family member F isoform X1		XP_002728578.2	1,23*	1,37 (p=0,1)	1,11

1686	POTE ankyrin domain family member F isoform X1		XP_002728578.2	2,46*	3,04*	1,24
1175	tubulin beta-2B chain	Tubb2b	NP_001013908.2	2,79 (p=0,1)	4,18*	1,5
1186	POTE ankyrin domain family member F isoform X2		XP_002725368.2	-1,08	1,28 (p=0,1)	1,38*
1296	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	Gnao1	AAA41262.1	-1,08	-1,19*	-1,11
1390	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Mdh1	AAH59124.1	-1,12 (p=0,1)	1,03	1,15*

● Ratio es el promedio del grado de diferencia de la abundancia estandarizada para el spot proteico entre dos grupos experimentales. Es una expresión de la relación de volúmenes estandarizados de un spot entre 2 grupos. Las disminuciones en la expresión se expresan con valores en el rango $-\infty$ to -1 , y los aumentos de expresión con valores en el rango $+1$ to $+\infty$. Un aumento al doble se indica con el número 2, y una disminución a la mitad se indica cómo -2 (no 0.5). Por ejemplo, si en la comparación CV vs AV el ratio es -2 , esto implica que en el grupo AV la expresión está disminuida a la mitad, con respecto al control CV.

* corresponde a $p < 0,05$ en prueba t de student en la comparación entre las 2 condiciones que se indican en el nombre de la columna.

De estos datos se depende que la asfixia alteró significativamente la expresión de 11 proteínas: Hspa4, Eef2, Tf, Hspa8, Tkt, Dpysl3, Pkm, Atp6v1b2, Tuba1b, Eno1, y POTE ankyrin domain family member F isoform X1, y con valores p cercanos a la significancia estadística: Mdh1, y Tubb2b. Por otro lado, en la comparación AV vs AQ la quercetina alteró significativamente la expresión de 5 proteínas: Dpysl2, Ppp2r1a, Hnrnpk, POTE ankyrin domain family member F isoform X2, Mdh1, y con valores p cercanos a la significancia estadística a Ppp3ca, Alb y Tuba1b. Además, en la comparación CV vs AQ encontramos alterada la expresión de otras 3 proteínas: POTE ankyrin domain family member F isoform X1, Tubb2b y Gnao1.

Al hacer el análisis de enriquecimiento del consorcio STRING (Szklarczyk et al., 2017) encontramos, que en el caso de las proteínas identificadas, que son reguladas por la asfixia, los procesos biológicos del gene Ontology Consortium (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2017) enriquecidos significativamente son en su gran mayoría procesos metabólicos, como el metabolismo de nucleótidos, de compuestos orgánicos nitrogenados, de ribosa fosfato, de ATP, así como la generación de metabolitos precursores, y generación de energía, la glicolisis, polimerización proteica y desarrollo (Figura 12). En el caso de las proteínas reguladas por el tratamiento con quercetina el único proceso biológico enriquecido fue el de respuesta a sustancia orgánica.

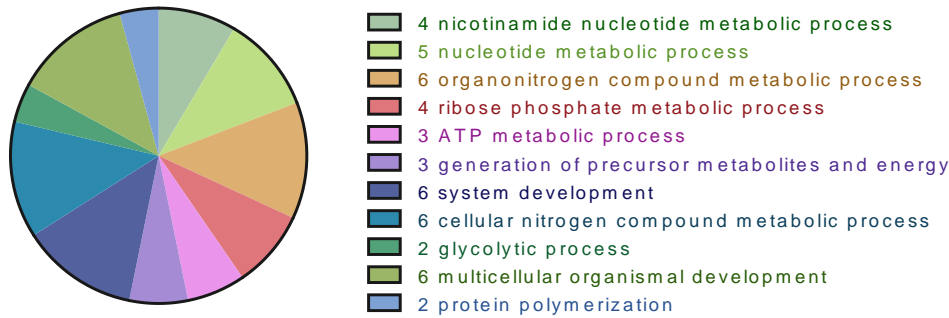


Figura 12. Procesos biológicos de Gene Ontology Consortium en los que participan las proteínas identificadas reguladas por la asfixia, según el análisis del Consorcio STRING. Los números corresponden al número de proteínas identificadas que participan en cada proceso.

Además del análisis de los procesos biológicos, mediante el análisis de enriquecimiento del consorcio STRING (Szkłarczyk et al., 2017) encontramos que las vías KEGG (Kanehisa, Furumichi, Tanabe, Sato, & Morishima, 2017) significativamente más representadas en el grupo de proteínas cuya expresión se ve alterada por la asfixia son: Carbon metabolism ($p=0,00581$, ID vía: 01200), Microbial metabolism in diverse environments ($p=0,00752$, ID vía: 01120), Phagosome ($p=0,00752$, ID vía: 04145), Pyruvate metabolism ($p=0,0144$, ID vía 00620), Biosynthesis of amino acids ($p=0,0367$, ID vía: 01230), Gap junction ($p=0,0367$, ID vía: 04540). Mientras que en el grupo de proteínas cuya expresión se vio alterada por el tratamiento con quercetina las vías KEGG enriquecidas son: Dopaminergic synapse ($p=0,00334$, ID vía: 04728), Long-term depression ($p=0,0296$, ID vía: 04730), Gap junction ($p=0,0366$ 04540), Glutamatergic synapse ($p=0,0366$, ID vía: 04724), y Axon guidance ($p=0,0413$, ID vía 04360).

En el caso de las proteínas cuya expresión se vio alterada por la asfixia, la red de interacciones generadas por esta plataforma presentó un número de interacciones significativamente mayor a las esperadas debidas al azar, y se muestra en la Figura 13A, donde se resalta en colores aquellas proteínas que participan en las distintas vías KEGG mencionadas. Mientras que, en el caso de las proteínas cuya expresión cambió con el tratamiento con quercetina, el número de interacciones presente en la red de interacciones del consorcio STRING (Figura 13B) no fue significativo. Las proteínas ankyrin domain family member F isoform X1 y ankyrin domain family member F isoform X2 no fueron encontrados en la base de datos del STRING.

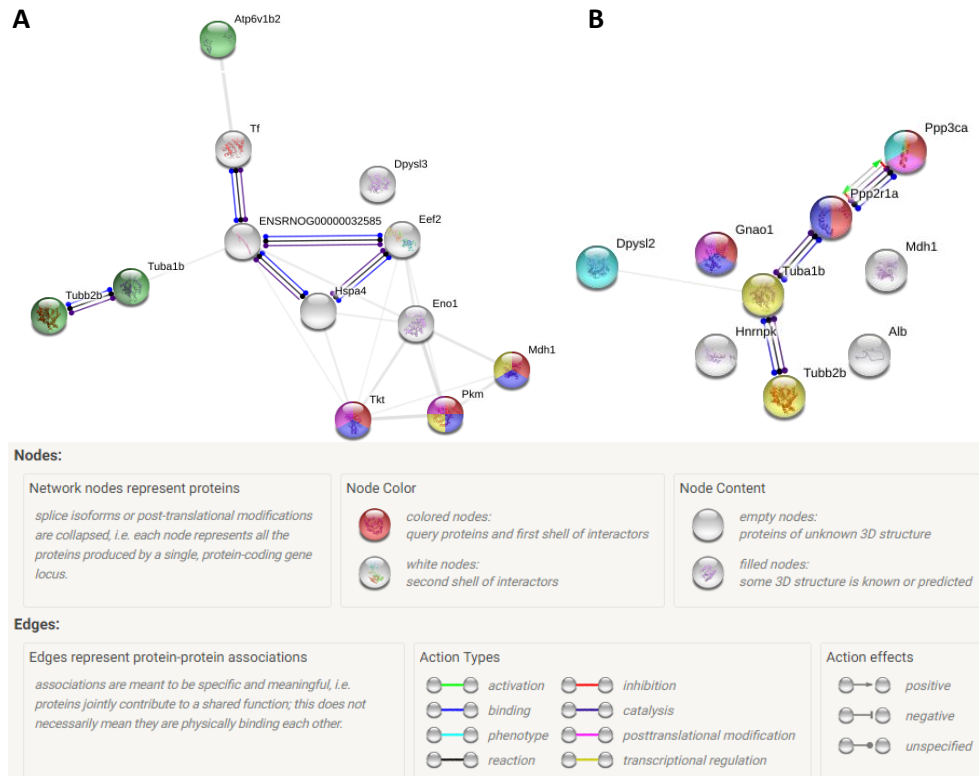


Figura 13. Red de interacciones según el Consorcio STRING entre las proteínas identificadas por espectrometría de masas y diferencialmente expresadas seleccionadas por 2D-DIGE. La red se construye en base a interacciones confirmadas (obtenidas de bases de datos curadas, o evidencia experimental), a interacciones esperadas (en base a contexto genómico, fusión génica, co-ocurrencia de genes) y en base a información adicional como textmining, co-expresión y homología proteica). Los nodos representan las proteínas, y los ejes o líneas colectores representan las interacciones basadas en toda la información obtenida de la base de datos. Los colores de las líneas y la forma del conector representan el tipo de acción de una proteína sobre la otra, en los casos en que haya una acción directa entre ambas. A) Red de interacciones entre proteínas cuya expresión se vio afectada por la asfixia. En los nodos se coloreó aquellas proteínas que participan en las vías KEGG significativamente enriquecidas: Carbon metabolism (●), Microbial metabolism in diverse environments (●), Phagosome (●), Pyruvate metabolism (●), Biosynthesis of amino acids (●), y gap junction (●). B) Red de interacciones entre proteínas cuya expresión se vio alterada tras el tratamiento con quercetina. En los nodos se coloreó aquellas proteínas que participan en las vías KEGG significativamente enriquecidas: Dopaminergic synapse (●), Long-term depression (●), Gap junction (●), Glutamatergic synapse (●), y Axon guidance (●).

4. Evaluación de evidencias de daño y/o de protección en parámetros fisiológicos y comportamentales

4.1. Ganancia de peso

Para evaluar si tanto el daño asfíctico como el tratamiento con quercetina afectan el crecimiento de los individuos y su capacidad de aumentar de peso, se los pesó regularmente y se calculó la ganancia de peso de los individuos. En el caso de los machos, los animales que sufrieron asfixia presentaron menor ganancia de peso durante la infancia que los grupos control (ANOVA de medidas repetidas $p < 0,05$ para todas las edades en la infancia entre las condiciones C y A; Figura 14). Sin embargo, esta diferencia observada no parece extenderse hacia la etapa adolescente y adulta, etapa en la cual los pesos se equipararon (Por ejemplo, en P40 la ganancia de peso, expresada como porcentaje con respecto al peso en P1 fue: CV: $3.236 \pm 110\%$, CQ: $3.093 \pm 85\%$, AV: $3.112 \pm 86\%$, AQ: $3.198 \pm 98\%$; ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,16)} = 0,097$, $p = \text{NS}$).

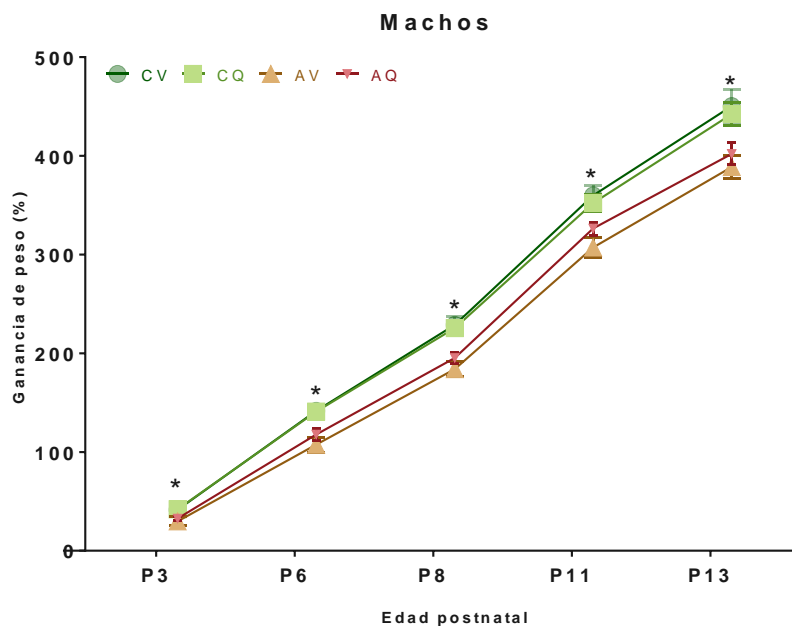


Figura 14. Ganancia de peso en machos durante la infancia expresada como porcentaje en función del peso en P1. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. *corresponde a $p < 0,05$ en ANOVA de medidas repetidas entre condiciones C y A. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

En las hembras, igualmente se observó que ambos grupos asfícticos tenían significativamente menor ganancia de peso respecto de los grupos control, a partir del día postnatal 6 y se mantenía disminuido hasta el día postnatal 13 (último día

evaluado en la infancia) (ANOVA de medidas repetidas $p < 0,05$ en P6, P8, P11 y P13 entre las condiciones C y A). No se encontraron diferencias debidas a la administración de quercetina, a excepción de P3 donde se observan que los grupos (tanto control como asfixia) que recibieron quercetina tienen menor peso que los que recibieron vehículo (ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,17)} = 5,2$ $p < 0,05$ entre los tratamientos V y Q; Figura 15).

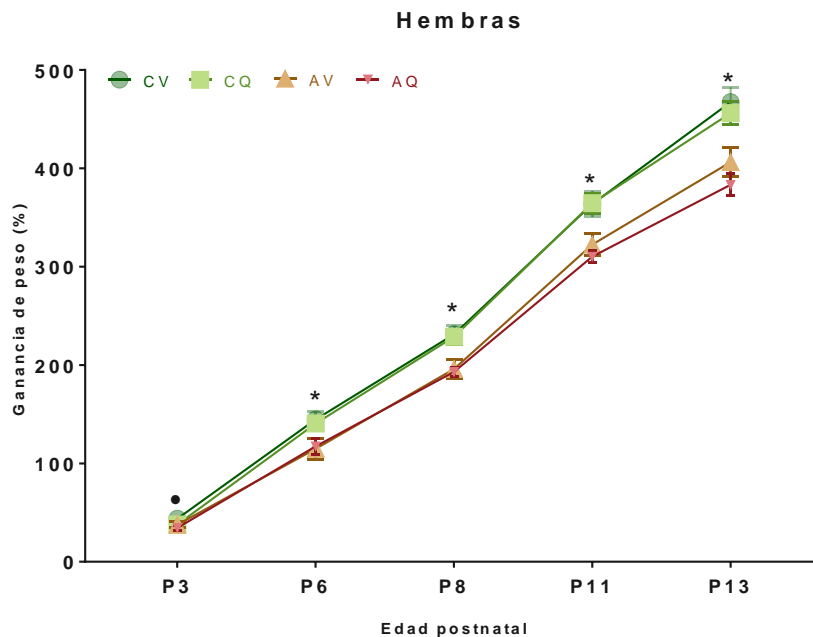


Figura 15. Ganancia de peso en hembras durante la infancia expresada como porcentaje en función del peso en P1. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. *corresponde a $p < 0,05$ en ANOVA de medidas repetidas entre condiciones C y A, y ●corresponde a $p < 0,05$ en ANOVA de medidas repetidas entre inyecciones V y Q. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

Para evaluar si las habilidades motoras de los individuos se ven alteradas tras la asfixia o el tratamiento con quercetina se realizaron las pruebas de evaluación del reflejo de enderezamiento, *gait* o desplazamiento y geotaxis negativa.

En la evaluación del **reflejo de enderezamiento** (pasar de posición supina a prona), encontramos que, en el caso de los machos P3, las crías control (tanto CV como CQ) ya son capaces de enderezarse en menos de 5 segundos, mientras que al grupo AV le lleva casi 20 segundos, con una gran variabilidad asociada (CV vs AV: $U_{(11,12)} = 15,0$, $p < 0,05$ en prueba U de Mann-Whitney; Figura 16). En cambio, el tiempo necesario para enderezarse de los individuos del grupo AQ no difirió del control (CQ vs AQ $U_{(11,12)} = 40,0$, $p = NS$ en prueba U de Mann-Whitney; Figura 16), pero si del grupo AV (AV vs AQ: $T_{(12)} = 6,0$, $p < 0,05$ en prueba pareada de Wilcoxon; Figura 16). Ese aumento

en el tiempo de respuesta de los animales sometidos a asfixia sin administración de quercetina no se observa en el caso de las hembras, donde todos los grupos presentan un tiempo de respuesta similar a partir del día postnatal 3 (Figura 16). En los días P6 y P8, ya todos los animales son capaces de presentar la respuesta en tiempos similares.

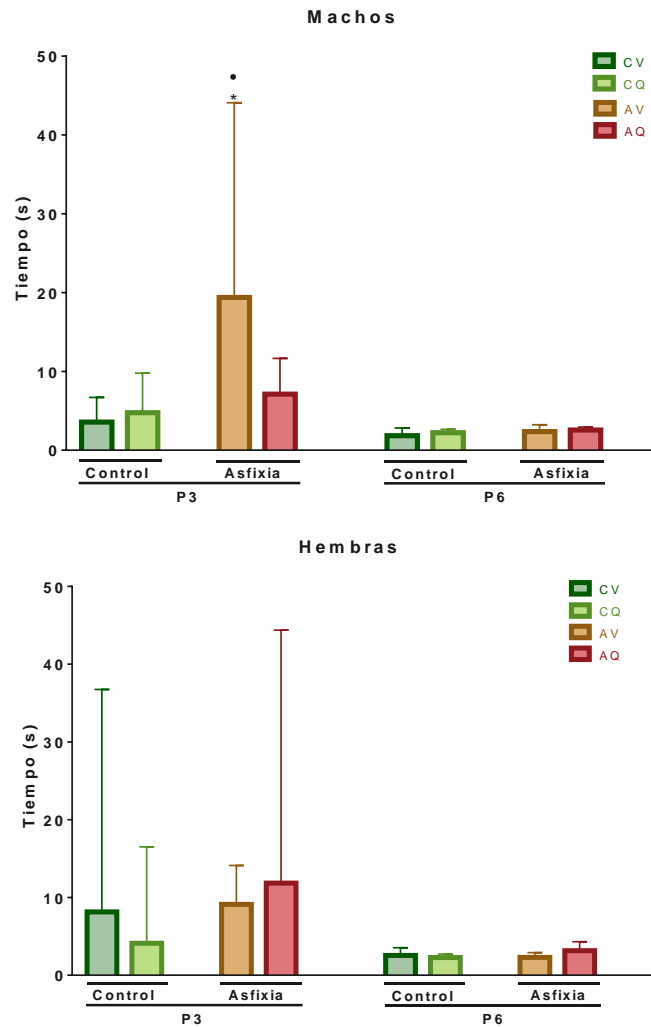


Figura 16. Respuesta al reflejo de enderezamiento durante la infancia medida como el tiempo que le lleva al animal pasar de posición supina a prona. El gráfico de la izquierda corresponde a los machos y el de la derecha a hembras. Se grafica la mediana y la desviación absoluta media. *corresponde a $p < 0,05$ prueba U de Mann-Whitney entre grupo AV y CV. • corresponde a $p < 0,05$ prueba pareada de Wilcoxon entre grupo AV y AQ. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

En la prueba motora de **desplazamiento o gait**, en los grupos control, entre el 80% y el 100% de los animales logra completar la prueba, mientras que en los animales sometidos a asfixia alrededor del 55% de los machos y entre 33-38% de las hembras logra trasladarse del círculo en menos de 30 segundos, un porcentaje mucho menor

al de los controles. En el caso de las hembras esta diferencia fue significativa (CV vs AV: $p < 0,05$ y CQ vs AQ: $p = 0,07$ en prueba exacta de Fisher; Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de animales que completan la prueba de desplazamiento en el tiempo estipulado.

Grupo	Sexo	
	Machos	Hembras
CV	80 % (8/10)	100 % (10/10)
AV	55 % (6/11)●	38 % (3/8)*
CQ	100 % (10/10)	80 % (8/10)
AQ	55 % (6/11)●	33 % (3/9)*

*Corresponde a $p < 0,05$ en prueba exacta de Fisher en hembras en comparaciones entre CV y AV, y $p = 0,07$ entre CQ y AQ.

●Corresponde a $p < 0,05$ en prueba exacta de Fisher en machos en comparaciones entre CV y AV, y entre CQ y AQ

Para los machos, se encontró que a ambos grupos sometidos a asfixia les lleva mayor tiempo moverse afuera del círculo que a los grupos control, pero estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística. En las hembras se observó el mismo efecto, pero más marcado (CV vs AV: $U_{(10,8)} = 11,0$ $p < 0,05$ y CQ vs AQ: $U(10,9) = 25,0$ $p = 0,1$ en prueba U de Mann-Whitney; Figura 17).

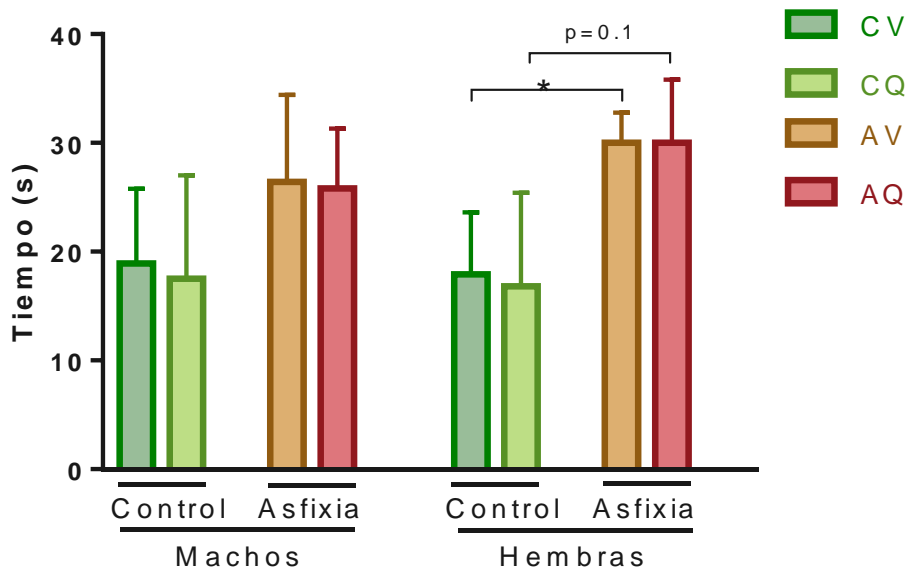


Figura 17. Prueba de desplazamiento "gait". Se grafica el tiempo que les lleva a los individuos de cada grupo y de cada sexo completar la prueba de desplazamiento. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. *corresponde $p < 0,05$ prueba U de Mann-Whitney. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

En la prueba de **geotaxis negativa**, en el caso de los machos, el porcentaje de machos asfícticos que logró completar la prueba, logrando girar 180 ° y subir la rampa en el tiempo de prueba fue de tan solo un 60% (CQ vs AQ: $p < 0,05$, CV vs AV $p = NS$ en prueba exacta de Fisher; Tabla 5), mientras que entre el 90% y el 100% de los animales control completaron exitosamente la prueba. En su amplia mayoría, las hembras de cada grupo completaron la prueba (88% en los grupos asfícticos, y entre 90 y 100% en los grupos control, $p = NS$ en prueba exacta de Fisher).

Tabla 5. Porcentaje de animales que completa la prueba de geotaxis negativa.

Grupo	Sexo	
	Machos	Hembras
CV	90 (9/10)	90 (9/10)
AV	60 (6/10)	88 (7/8)
CQ	100 (10/10)	100 (10/10)
AQ	60 (6/10) *	88 (7/8)

*Corresponde a $p < 0,05$ prueba exacta de Fisher en comparación CQ vs AQ en machos.

En la prueba de geotaxis negativa no se encontraron diferencias en cuanto al tiempo que les lleva realizar la prueba, independientemente del grupo experimental al que pertenecen tanto en machos como en hembras (Figura 18).

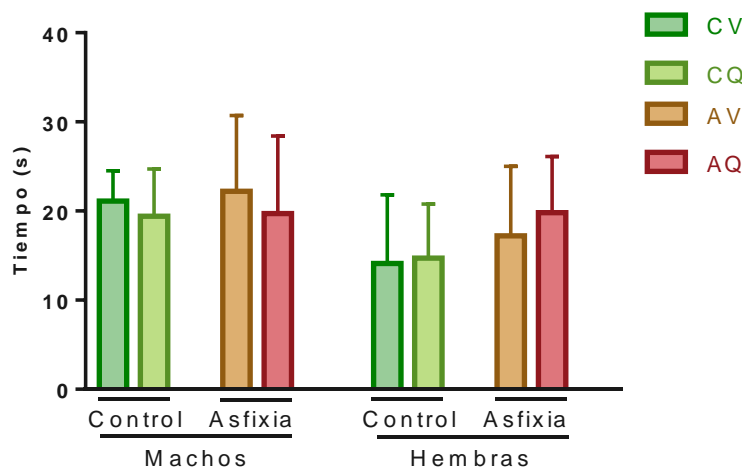


Figura 18. Prueba de geotaxis negativa. Se representa gráficamente el tiempo (segundos) que les lleva a los individuos de los diferentes grupos experimentales completar la prueba. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

4.2.2. Pruebas de memoria en la infancia, adolescencia y etapa adulta

Para evaluar si en las condiciones experimentales se afecta la memoria, se realizaron dos pruebas de evaluación de la memoria y aprendizaje. Una de ellas es la prueba de memoria olfativa realizada en la infancia, que evalúa si las crías son capaces de recordar y reconocer el olor materno que emana de la viruta proveniente de nido.

En la prueba de memoria olfativa, el valor central del índice de preferencia fue mayor a 0,5 en todos los grupos experimentales, y no se encontraron diferencias significativas en el valor de este índice entre los diferentes grupos en ninguno de los sexos (CV vs AV y CQ vs AQ: Prueba U de Mann Whitney $p=NS$, CV vs CQ y AV vs AQ: Prueba pareada de Wilcoxon $p=NS$; Figura 19).

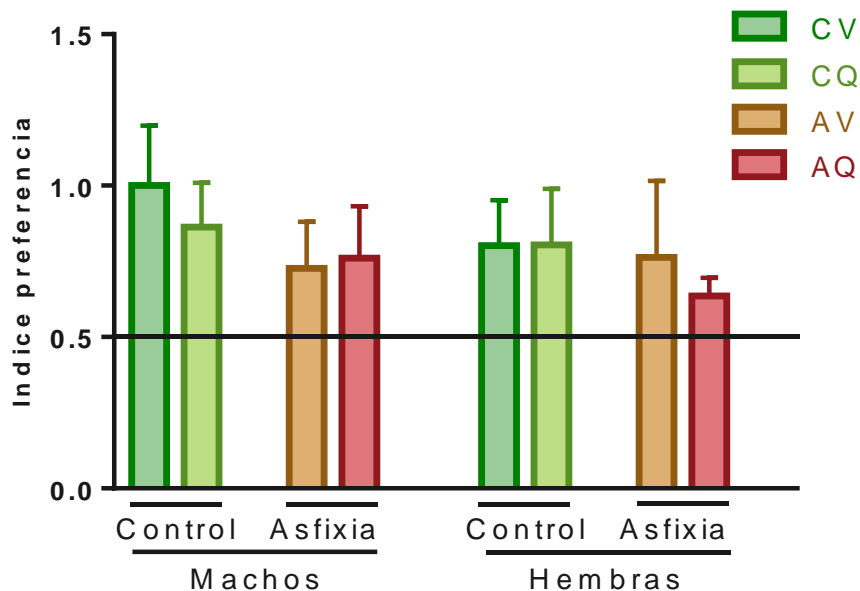


Figura 19. Índice de preferencia en prueba de memoria olfativa. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. Un índice mayor a 0,5 es definido como criterio de que el individuo, o el grupo experimental, mostró preferencia por el olor materno. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

A pesar de ello, en hembras sometidas a asfixia con tratamiento con vehículo vacío (AV), se encontró una tendencia de una menor proporción de hembras que mostraron preferencia de acuerdo al criterio antes mencionado, en comparación con el grupo control (CV vs AV: Prueba exacta de Fisher $p=0,08$; Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de animales que muestran preferencia por el olor materno

Grupo	Sexo	
	Machos	Hembras
CV	89% (8/9)	100% (9/9)
AV	83% (10/12)	63% (5/8) ●
CQ	89% (8/9)	100% (9/9)
AQ	100 % (12/12)	89% (8/9)

●p=0.08 en prueba exacta de Fisher en la comparación en hembras entre CV vs AV.

La segunda prueba de memoria es la prueba de reconocimiento de objeto que se realiza en la adolescencia y adultez, y evalúa la capacidad de recordar y reconocer un determinado objeto. En esta prueba, se encontró que en ambas etapas de la vida los animales de los diferentes grupos experimentales fueron capaces de reconocer el objeto novedoso tanto a corto plazo (90 minutos después del entrenamiento) como a largo plazo (24 horas después del entrenamiento). A modo de ejemplo, en la Figura 20 se muestran los resultados para la prueba de memoria a largo plazo para ambas edades, en base a los índices de reconocimiento de objeto obtenidos para el entrenamiento y la prueba a largo plazo (LTM). Un valor $p < 0,05$ en la prueba pareada de Wilcoxon entre entrenamiento y prueba de memoria a largo plazo (LTM) en cada grupo implica que el animal recordó el objeto 24 horas después del entrenamiento, porque el índice es significativamente mayor para la prueba que para el entrenamiento.

En P40 todos los grupos experimentales recordaron el objeto novedoso (Prueba pareada de Wilcoxon $p < 0,05$ para los grupos CV, CQ y AV) o tendieron hacerlo como en el caso del grupo AQ ($p = 0,07$ para AQ). A pesar de ello, se evidenció que los grupos asfícticos tienen una tendencia a tener índices de reconocimiento menores que los de sus respectivos controles (CV vs HV: Prueba U de Mann Whitney $U(9,10) = 23,0$ $p = 0,08$; CQ vs AQ: $U(9,10) = 21,0$ $p = 0,05$). En P60 todos los grupos aprenden a reconocer los objetos, y ya no se observan diferencias en los índices de reconocimiento de los distintos grupos.

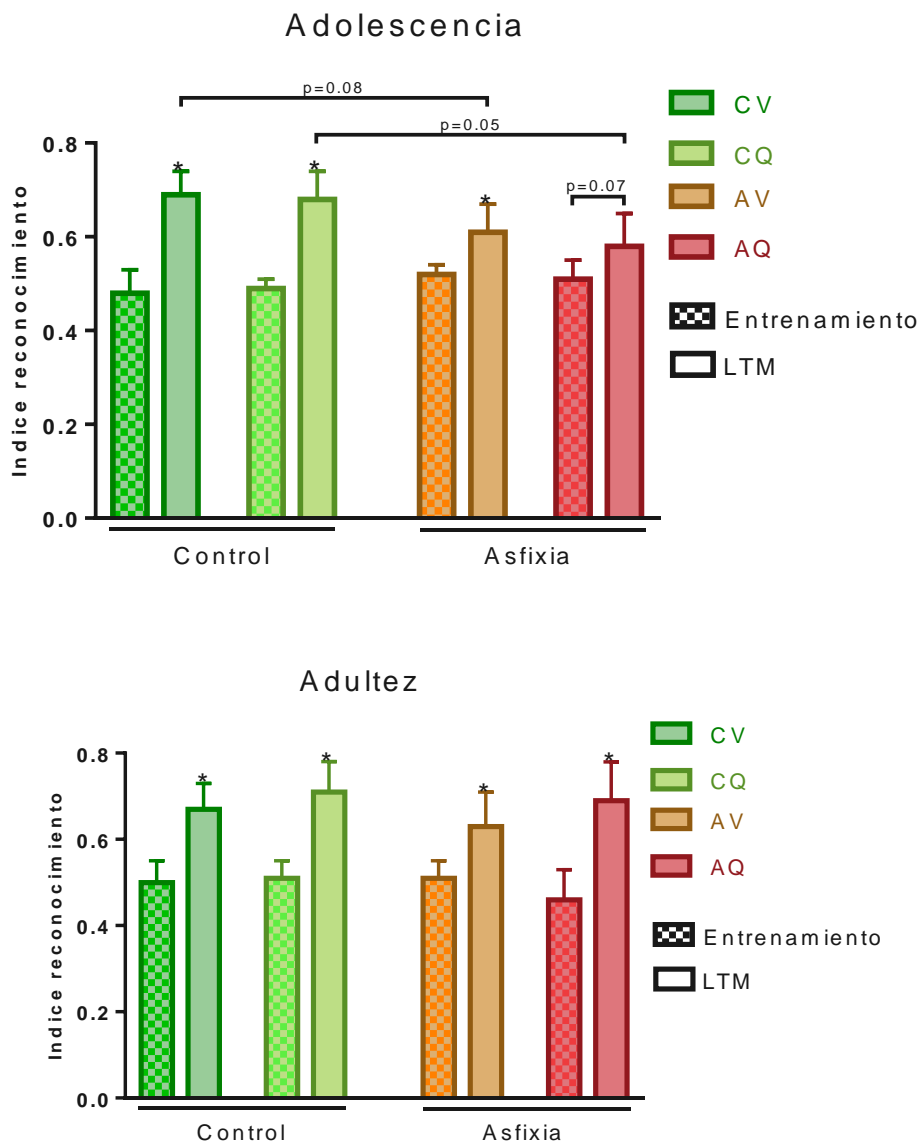


Figura 20. Índice de reconocimiento de objeto en prueba de memoria a largo plazo. Arriba se muestran los resultados obtenidos en la adolescencia, y abajo los resultados obtenidos en la adultez temprana. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. *= $p < 0,05$ en prueba pareada de Wilcoxon. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina. LTM: prueba de memoria a largo plazo.

4.2.3. Pruebas de ansiedad experimental durante la infancia, adolescencia y etapa adulta

Se evaluó si la asfixia o el tratamiento con quercetina afectan el estado de ansiedad de los animales mediante dos pruebas de ansiedad experimental: la prueba de potenciación materna y la prueba de campo abierto.

En la prueba de potenciación materna, se encontró que ni la asfixia ni el tratamiento con quercetina modifican la respuesta potenciada de la cría luego de la interacción con la madre. Como puede observarse en la Figura 21, tanto en hembras como en machos, todos los grupos experimentales presentaron potenciación, es decir que el número de ultravocalizaciones (USV) fue significativamente mayor en el segundo aislamiento respecto del primer aislamiento (Para todas las comparaciones $p < 0.05$ prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

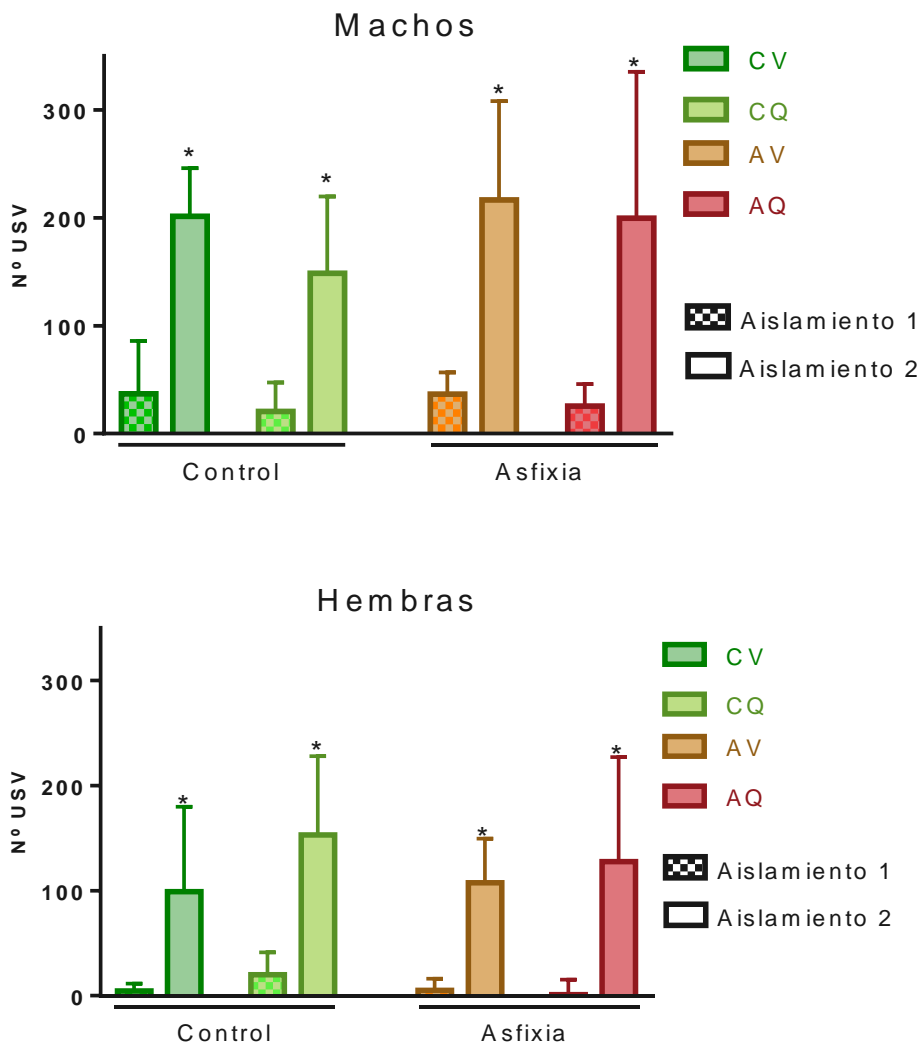


Figura 21. Resultados de la prueba de potenciación materna en P13. Se presenta el número de ultravocalizaciones realizadas en ambos aislamientos, y se comparan entre sí para cada grupo. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. Arriba: Machos, Abajo: Hembras. * corresponde a $p < 0.05$ en prueba de Wilcoxon para muestras pareadas en la comparación entre aislamiento 1 y aislamiento 2 para cada grupo. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

En cuanto al número de vocalizaciones durante el período de interacción con la madre, se encontraron diferencias en las hembras, donde los animales AV vocalizaron significativamente menos que el grupo AQ (Prueba pareada de Wilcoxon $T_{(8)} = 4,0$ $p < 0,05$). Cuando comparamos los grupos AV y CV en machos y hembras, vemos efectos opuestos de la asfixia de acuerdo al sexo: en machos el número de ultravocalizaciones aumenta, mientras que en hembras disminuye, no siendo significativas las diferencias (solo se observa una tendencia $p = 0.1$ en prueba U Mann Whitney en el caso de los machos). Sin embargo, cuando comparamos el nº de USV entre machos AV y hembras AV, la diferencia sí resulta significativa (Prueba pareada de Wilcoxon $T_{(8)} = 0$, $p < 0,05$, Figura 22).

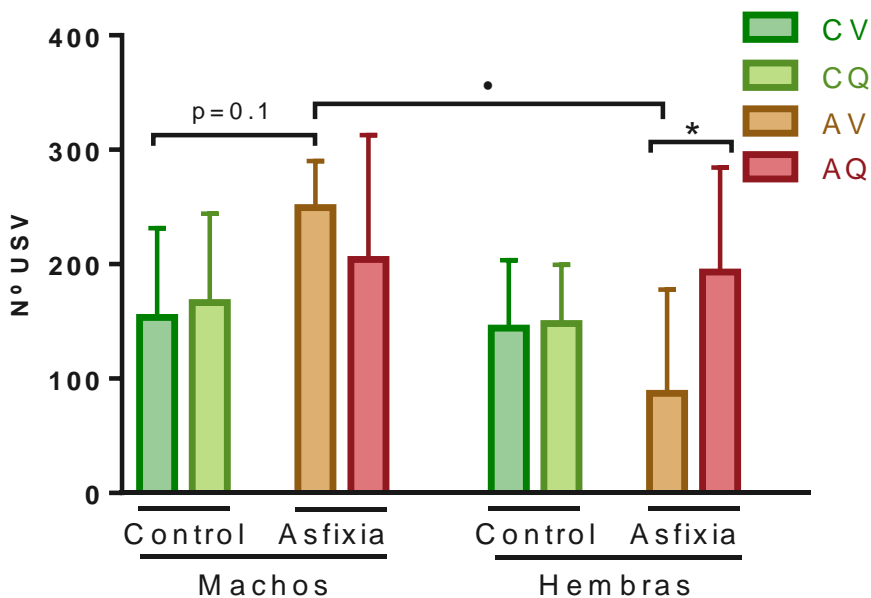


Figura 22. Número de ultravocalizaciones en el período de interacción en la prueba de potenciación maternal. Los datos se presentan como mediana y rango semi-intercuartil. * corresponde a $p < 0.05$ en prueba de Wilcoxon para muestras pareadas en la comparación en hembras entre AV y AQ. • corresponde a $p < 0,05$ en prueba de Wilcoxon en la comparación entre el grupo AV en machos y el grupo AV en hembras. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

En lo que respecta a los cuidados maternos durante el período de interacción, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados: olfateos, lamidos, acarreo y tiempo de no contacto, ni entre sexos, ni entre diferentes condiciones experimentales (Tabla 7).

Tabla 7. Cuidados maternos en prueba de potenciación maternal

	No contacto		Lamidos		Olfateos		Acarreos	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
CV	102 (29)	103 (49)	2 (2)	2 (2)	7 (2)	6 (1)	7 (7)	5 (7)
CQ	106 (53)	124 (25)	2 (3)	1 (3)	5 (2)	6 (1)	6 (8)	7 (7)
AV	127 (36)	124 (30)	1 (2)	1 (2)	6 (3)	6 (2)	5 (6)	5 (6)
AQ	98 (41)	146 (28)	3 (3)	1 (1)	6 (3)	9 (4)	7 (9)	2 (7)

Los datos se presentan como: mediana (rango semi-intercuartil).

En cuanto a la prueba de ansiedad experimental de campo abierto realizada en machos adolescentes y adultos, no se encontraron diferencias en los cruces en el área central, ni en el tiempo que pasan en el área central ni en la adolescencia ni en la adultez. En la adolescencia, el grupo AV tuvo una tendencia a un mayor número de posturas erguidas (rearings) durante la prueba que el grupo CV (Prueba U de Mann-Whitney $U_{(9,11)} = 29$, $p=0,1$). En la adultez, observamos en cambio que el grupo AV tuvo significativamente menor número de cruces en la periferia que el grupo CV (Prueba U de Mann-Whitney $U_{(11,11)} = 27,5$, $p<0,05$). Se observó el mismo comportamiento en el grupo AQ (en comparación con el grupo CQ), pero las diferencias no fueron significativas estadísticamente. En la Tabla 8 se resumen los resultados de número de cruces realizados en la periferia y en el área central, y el número de rearings.

Tabla 8. Resultados en prueba campo abierto

Grupo	Cruces periferia	Cruces área central	Posturas erguidas	
CV	157 (37)	28 (11)	50 (17)	Adolescencia
AV	170 (40)	24 (16)	74 (10)●	
CQ	147 (21)	15 (11)	50 (11)	
AQ	162 (33)	18 (8)	60 (12)	
CV	146 (32)	12 (18)	39 (16)	Adultez
AV	105 (40)*	5 (6)	26 (9)	
CQ	146 (53)	9 (13)	29 (15)	
AQ	88 (25)	2 (7)	21 (5)	

Los datos se presentan como: mediana (rango semi-intercuartil). * $p < 0,05$ en prueba U de Mann-Whitney en la comparación entre CV y AV. ● $p=0.1$ en prueba U de Mann-Whitney en la comparación entre CV vs AV.

4.3. Determinación del peso de hipocampo

Para evaluar si existen cambios a nivel de hipocampo, estructura implicada en procesos de memoria y aprendizaje, a los 70 días de vida, los animales se sacrificaron, y se pesó el hipocampo. Los resultados se muestran en la Figura 23. Se observó que en los animales sometidos a asfixia el peso del hipocampo fue significativamente menor en relación a los grupos control (ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,8)} = 5,5$ $p < 0,05$ en la comparación de las condiciones C vs A). Además, encontramos que la quercetina revierte este efecto (ANOVA de medidas repetidas: $F_{(1,8)} = 10,4$ $p < 0,05$ en la interacción de las condiciones C y A, con las variables dependientes Q y V). Al realizar la prueba post-hoc de Bonferroni encontramos que el grupo AV tiene significativamente menor peso de hipocampo que el grupo CV ($p < 0,05$).

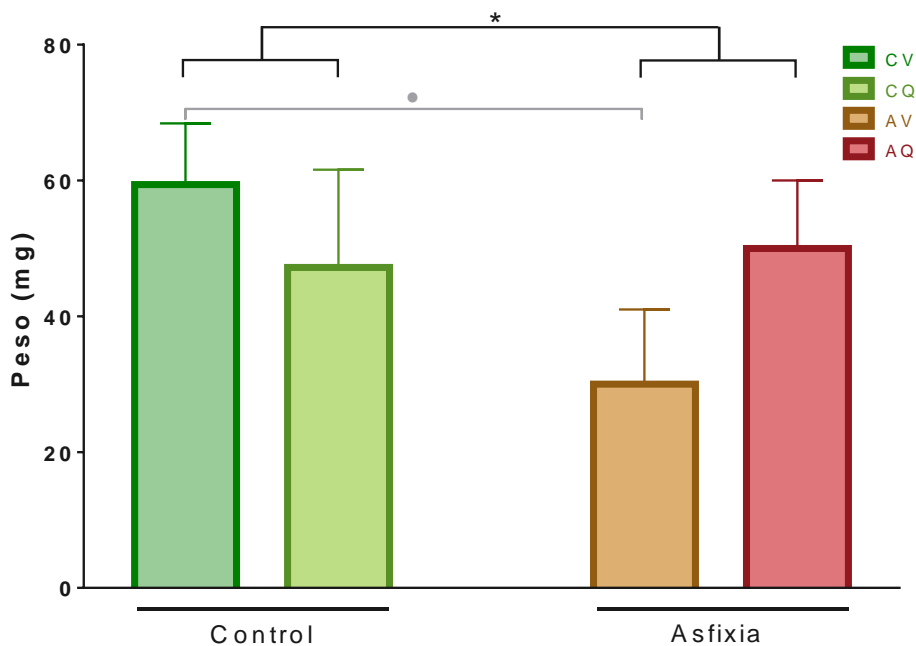


Figura 23. Peso de hipocampo en machos P70 expresado en mg. Los datos se presentan como media y error estándar. * representa $p < 0,05$ en la interacción en ANOVA de medidas repetidas. • corresponde a $p < 0,05$ en post-hoc de Bonferroni entre CV y AV. CV: control vehículo, CQ: control quercetina, AV: asfixia vehículo, AQ: asfixia quercetina.

Discusión

En este trabajo de Maestría nos propusimos estudiar la capacidad neuroprotectora de un preparado nanosomal de quercetina en el modelo de asfixia perinatal en ratas, y ahondar en la disección de los posibles mecanismos de acción subyacentes al efecto protector, a la vez que contribuir a la caracterización del daño asfíctico en este modelo. Nos propusimos abordarlo desde diversas perspectivas, ya que la quercetina parece ser un compuesto con multiplicidad de acciones y de blancos moleculares.

Biodisponibilidad cerebral de quercetina

En la medida que nuestro objetivo apunta a los efectos de la quercetina a nivel del sistema nervioso, en el presente trabajo se confirmó el acceso a nivel cerebral de la quercetina vehiculizada en un nanosoma, cuando es administrada por vía intraperitoneal. Este preparado nanosomal ha sido ensayado ampliamente en el modelo de cerdo (Blasina et al., 2015), pero no en el modelo de rata, donde había sido ensayado un preparado liposomal de diferente composición (Rivera et al., 2004a). Los valores máximos obtenidos por nosotros para la administración intraperitoneal son inferiores a otros reportados en trabajos anteriores (Blasina et al., 2015; Rivera et al., 2004a), lo que podría explicarse por diferente dosis, diferente edad del animal y distinta formulación del vehículo, o por tratarse de una vía de administración diferente (intravenosa) en el caso del trabajo de Blasina y colaboradores. Esto puede sugerir que el efecto de la quercetina, puede ser mayor al observado en el presente trabajo si se alcanzan mayores concentraciones, y que serían necesarios más estudios para conocer la concentración requerida a nivel del cerebro, es decir conocer una dosis terapéutica.

En el presente trabajo se encontró que el máximo de concentración cerebral de quercetina administrada intraperitonealmente se da a los 15 minutos luego de la inyección, un tiempo menor al reportado en otros trabajos (Blasina et al., 2015; Rivera et al., 2004a), lo cual también podría explicarse por los motivos anteriormente expuestos. Por tanto, esta vía de administración resultó muy apropiada para su aplicación en nuestro modelo experimental por su rapidez y eficacia. Este acceso rápido al tejido de interés resultaría ventajoso en un contexto de daño agudo, para poder aplicar rápidamente la terapia.

Por otro lado, se ensayó por primera vez la administración intranasal de esta formulación. Los datos de la biodisponibilidad tras la administración intranasal son aún preliminares, dado que en algunos tiempos (15 y 60 min) se contó con un N=2. Sin embargo, estos resultados demuestran que la quercetina efectivamente accede a nivel cerebral cuando es administrada intranasalmente y vehiculizada en nanosomas. A su vez, la concentración máxima de quercetina observada fue inferior en la administración intranasal en comparación con la intraperitoneal, con una cinética más lenta. Esto podría deberse a que la administración en comparación con la intraperitoneal es más prolongada, realizándose en el transcurso de una hora, y también debido a que parte de lo administrado por vía intranasal es deglutido por la cría, por lo que la dosis administrada real puede ser menor de lo que se cree. Si bien se necesitan más ensayos para determinar con mayor confianza la biodisponibilidad cerebral de la quercetina encapsulada en nanosomas cuando es administrada por vía intranasal, nuestros resultados indican que la administración intranasal es posible y la quercetina logra acceder al cerebro cuando es administrada por esta vía. Sin embargo, optamos por no utilizarla para experimentos de asfixia dada la excesiva manipulación de los animales que necesariamente implica.

Si bien la vía intraperitoneal es muy utilizada en investigación, su utilidad a la hora de extrapolar a la clínica es escasa. Sin embargo, la administración intranasal es muy prometedora para su aplicación en humanos, pero se deben resolver algunas dificultades como el volumen a administrar. El volumen está vinculado a la concentración del preparado que se ha logrado alcanzar hasta el momento, por lo cual es interesante la posibilidad de liofilización y/o vaporización del preparado, aspectos en los que el grupo del Dr. Dajas viene trabajando.

Otro aspecto a mencionar en lo que respecta a nuestros resultados, es la elevada variabilidad individual observada en la biodisponibilidad. Este sería uno de los factores que explicaría una alta variabilidad en los restantes ensayos realizados dificultando la obtención de resultados significativos estadísticamente. Este inconveniente ya ha sido reportado en la bibliografía (Ader, Wessmann, & Wolfram, 2000; Kaushik et al., 2012) y se debe corregir y/o considerar a la hora de diseñar un ensayo clínico.

A futuro, sería interesante profundizar estos estudios analizando la biodisponibilidad de la quercetina cuando es administrada en animales sometidos a asfixia, dado que la

asfixia implica una alteración sistémica que afecta a todos los órganos y sistemas, pudiendo alterar la distribución del preparado en el organismo.

Protocolo de asfixia perinatal y la sobrevida asociada

El modelo de asfixia perinatal (AP) seleccionado para este trabajo resultó en un daño severo en las crías neonatas, lo cual evidenciamos no solamente a través de la elevada mortalidad del protocolo ($58 \pm 7 \%$), sino que a su vez, el estado físico de los animales luego de la reanimación, con un color pálido, con una postura atípica (las patas posteriores estiradas y rígidas), con respiración forzada a bocanadas, con poca o nula movilidad, y ausencia de vocalizaciones, entre otros, ponía de manifiesto la injuria ocasionada.

Este protocolo se puede encontrar en la bibliografía con diferentes tiempos de inmersión que van desde 14 a 20 minutos. En nuestras condiciones la mortalidad fue del 100% cuando se ensayaron tiempos mayores a 15 minutos de inmersión. Los autores que trabajan con este protocolo suelen clasificar la severidad del evento de acuerdo a la duración del tiempo de inmersión: inmersión por 10 minutos se asocia a una AP leve, 15 minutos a una AP moderada, mientras que 20 minutos constituye una AP severa. El protocolo ensayado en este trabajo, con una duración de 15 minutos, correspondería por tanto a una AP moderada. Sin embargo, debido a la alta tasa de mortalidad, y a la evaluación post asfixia de las crías consideramos que se asemeja más a un evento severo, ya que de acuerdo con la bibliografía con 15-16 minutos de asfixia sobrevive casi el 100% de los individuos, mientras que con 19–20 minutos las tasas de mortalidad en esos mismos estudios van desde 30–70% (Yong Chen et al., 1997; E. Dell’Anna et al., 1997; C F Loidl et al., 1994).

Efecto de la quercetina en la sobrevida

Cómo se comentó en la introducción, son pocos los trabajos que relacionan la asfixia perinatal con el tratamiento con este flavonoide. De hecho, hasta donde podemos saber, este estudio es el primero en evaluar el efecto de la quercetina en el modelo de inmersión de Bjelke (1991) de asfixia perinatal. Mostramos que la quercetina aumentó la sobrevida de los animales asfícticos, evidenciando el efecto protector de la quercetina. Otros estudios que abordan este tema, han demostrado que la

quercetina mejora la función cerebral, así como el déficit cognitivo, mas no han reportado datos relativos a la sobrevivencia. Esto quizás se deba a que utilizan modelos diferentes en los que el daño se evidencia por parámetros distintos a la mortalidad (Blasina et al., 2015; Qu et al., 2014). Por otra parte, los mecanismos efectores no están claros aún, y en los trabajos citados se relacionaron con procesos de remielinización y estabilización del sistema hemodinámico. Mientras que en los trabajos que utilizan modelos de isquemia e hipoxia/reoxigenación se han reportado mayoritariamente mecanismos anti apoptóticos y antioxidantes (Ghosh, Sarkar, Mandal, & Das, 2013; Shutenko et al., 1999; Yao et al., 2012).

El rol del estrés oxidativo en el daño y/o en la protección

Debido al rol dañino que juega el estrés oxidativo generado durante la etapa de reoxigenación, y a que, en gran medida, los efectos beneficiosos de la quercetina se deben a su capacidad antioxidante nos propusimos evaluar si existían cambios en el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS). Encontramos que efectivamente los niveles de ROS están aumentados luego de la asfixia, sin embargo, contrariamente a lo que esperábamos, la quercetina no afectó el nivel de ROS al menos en los tiempos estudiados. Si bien la bibliografía que vincula al tratamiento con quercetina con niveles reducidos de distintos marcadores de daño oxidativo es amplia (revisado en Costa, Garrick, Roquè, & Pellacani, 2016), es posible que los efectos protectores observados en nuestro trabajo no se atribuyan a sus propiedades antioxidantes, sino a otros mecanismos de acción.

Las ROS se caracterizan por tener vida media muy corta. De hecho, de acuerdo con otros autores el máximo de detección de ROS, determinado por resonancia de espín electrónico, se da a los 5 minutos luego de comenzada la etapa de reanimación (Capani et al., 2001). En nuestro diseño experimental la inyección de quercetina se realiza tras lograr la reanimación (aproximadamente a los 15 minutos de comenzada la reanimación) por lo cual, no es posible hacer la determinación de ROS a tiempos menores. Esto sugiere que en este diseño experimental debemos buscar otros indicadores, como los que resultan de la acción de especies reactivas del oxígeno sobre otras moléculas biológicas.

Las especies reactivas del oxígeno están directamente involucradas, en tejidos isquémicos, en el daño oxidativo de macromoléculas como lípidos, proteínas, y

ácidos nucleicos, que llevan a la muerte celular (Chen 1997, McKracken 2000). Es por ello, que evaluamos como marcadores de daño oxidativo la peroxidación lipídica y el daño en el ADN.

La determinación de las especies reactivas con ácido tiobarbitúrico, sigue siendo el método más ampliamente empleado para la estimación de la peroxidación lipídica. Si bien observamos un aumento en la media aritmética en el grupo sometido a asfixia tratado con vehículo vacío, en comparación con el control, y una disminución en el grupo asfíctico tratado con quercetina cuando lo comparamos con el que recibió vehículo vacío, lo que sugeriría un efecto beneficioso de la quercetina, los resultados no son significativos. Dado que existe una gran variabilidad en los resultados, sería conveniente repetir este ensayo con un número mayor de individuos.

Ghosh y col. reportaron, en un modelo de isquemia cerebral, una restauración de los niveles normales de dienos conjugados (indicador de oxidación lipídica) en diferentes áreas del cerebro, mediante la administración de una dosis quercetina nanoencapsulada (2.7mg/kg) previa al insulto (Ghosh et al., 2013). Es posible que sea necesario administrar la quercetina más próximo al insulto para poder observar efectos claros sobre parámetros de estrés oxidativo. Numerosos estudios reportan que el máximo nivel de neuroprotección se observa tras un pretratamiento con un determinado flavonoide por 24 horas ya que permite un tiempo suficiente para que se desarrollen las respuestas adaptativas en la expresión génica que ayuden a resistir al estrés oxidativo (Gundimeda et al., 2012; Ha et al., 2003; Keddy et al., 2012; Leonardo et al., 2013; H.-Y. Li et al., 2012; R.-L. Liu et al., 2012; Z. A. Shah et al., 2010). Desde el punto de vista terapéutico, estos abordajes de pre-condicionamiento no son aplicables en eventos agudos que suceden de manera imprevista, como el evaluado en el presente trabajo.

En cuanto a los niveles de histona H2AX fosforilada, estudios previos *in vitro* sugieren que la hipoxia severa puede provocar una respuesta de daño en el ADN, implicando la activación de las vías de señalización de las quinasas ATR y ATM y la subsecuente fosforilación de H2AX (Bencokova et al., 2009; Hammond et al., 2003a,b, Dorie, & Giaccia, 2003). En nuestro caso, el análisis por western blot de los niveles de la forma fosforilada H2AX no mostró diferencias significativas. Sería interesante poder analizar el nivel de fosforilación de H2AX a menores y mayores tiempos luego del insulto, dado que, si bien la fosforilación comienza de forma inmediata al daño y

generalmente un aumento en la fosforilación es detectable luego de algunas horas, esto puede variar de acuerdo al sistema en que se está evaluando (Bencokova et al., 2009; C. Lin et al., 2012; Tsuchimoto et al., 2011).

Apoptosis

La muerte por apoptosis es una forma prominente de muerte neuronal en los modelos de hipoxia/isquemia. La cascada de activación de caspasas es mediada por caspasa 3, la cual una vez activada estimula la vía apoptótica mitocondrial, y es considerada un biomarcador de apoptosis neuronal y de lesión cerebral (Zhang et al., 2004, Cohen 1997). Numerosos estudios han encontrado, en diversos modelos, que 24 horas después de un evento de asfixia en el momento del parto, la expresión de caspasa-3 activa aumenta en diferentes áreas cerebrales como corteza e hipocampo (Sugawara 2002; Yang 2011, Huang 2013, Figueira 2016).

Nuestros datos indicarían también un aumento de la caspasa-3 clivada, 24 horas post asfixia en las áreas estudiadas. Más aún, la quercetina restituiría los valores normales, lo cual contribuiría a explicar su efecto protector. Estos resultados, si bien no fueron estadísticamente significativos, son prometedores para la comprensión y validación de un efecto de la quercetina. La falta de diferencias estadísticamente significativas quizás pueda deberse entre otros factores a una alta variabilidad individual experimental, sumado a una mayor labilidad de los tejidos asfícticos, muchos de los cuales no resistieron el procesamiento que la técnica de inmunofluorescencia conlleva. Posiblemente solo los tejidos más resistentes y con menor daño hayan sido utilizados para el análisis introduciendo así un posible sesgo. Sería por tanto interesante analizar el nivel de muerte celular por otras técnicas que no dependan de la integridad del tejido, como por ejemplo la determinación de la actividad caspasa 3.

En lo que respecta al hipocampo, numerosos estudios en modelos de asfixia en animales, incluidos el de inmersión, han reportado un menor número de células en el hipocampo en los animales que sufrieron asfixia (Bjelke et al., 1991; Huang et al., 2013). En cambio, de acuerdo a nuestros resultados, a las 24 horas no habría un nivel de muerte celular en el hipocampo tal que justifique la disminución del peso del hipocampo observada posteriormente. A pesar de ello, no podemos descartar que los procesos de muerte celular en este contexto se estén dando más tardíamente, lo

que podría explicar las diferencias encontradas en el peso. Es interesante resaltar que la quercetina reestableció el peso normal del hipocampo, abriendo la pregunta de si mecanismos antiapoptóticos están actuando sobre procesos de muerte celular que se profundizan con el correr de los días y semanas que suceden a la asfixia.

Para obtener un panorama más completo del posible rol de la quercetina en la inducción de mecanismos antiapoptóticos sería informativo evaluar los niveles de muerte celular a mayores tiempos luego de la asfixia, ya que otros autores han reportado efectos de la hipoxia neonatal sobre la muerte celular una semana (E. Dell'Anna et al., 1997; P Morales et al., 2005), un mes (Yong Chen et al., 1997; Johansen, Sørensen, Tønder, Zimmer, & Diemer, 1992; P. Morales et al., 2008) e incluso tres meses después del evento (Hoeger et al., 2006; Kohlhauser et al., 1999).

Crecimiento y desarrollo neurológico

Dada la alta prevalencia de las alteraciones neurológicas tras un evento de asfixia en el momento del parto, la evaluación de la capacidad protectora de cualquier compuesto, necesariamente debe incluir el análisis de parámetros comportamentales que permitan evaluar funciones neurológicas. Cabe destacar que diferentes autores han reportado efectos beneficiosos de la quercetina sobre distintos parámetros comportamentales emocionales y cognitivos en ratas adultas (Priprem, Watanatorn, Sutthiparinyanont, Phachonpai, & Muchimapura, 2008), en modelos de isquemia cerebral (Pu et al., 2007) e hipoxia hipobárica (P. Liu et al., 2015)

La inmensa mayoría de los trabajos sobre estrategias neuroprotectoras en injurias post-asfícticas se enfocan en los resultados histológicos inmediatos (como volumen de infarto o el nivel de muerte celular). Sin embargo, la injuria pos-asfíctica es un proceso que se extiende semanas e incluso meses luego del insulto inicial, que no necesariamente se correlaciona con daño extenso o explícito a nivel morfológico. En algunos casos resulta en déficits de comportamiento o funcionamiento cerebral sutiles (Strackx et al., 2010). Algunas de las estrategias neuroprotectoras podrían estar simplemente retrasando la injuria en vez de promover una protección a largo plazo, por lo que la preservación histológica no implica necesariamente que la función neuronal está preservada.

En concordancia con los resultados de otros autores (Bjelke et al., 1991; Peter Kiss et al., 2013), se encontró que durante la infancia la ganancia de peso fue menor en los grupos asfícticos en comparación al control, tanto en machos como en hembras. Las diferencias en la ganancia de peso se observan también en los niños recién nacidos asfícticos. Esto puede deberse a posibles dificultades motoras-orales, y/o de deglución que pueden interferir con la alimentación normal (Gulati, Shubert, Sitaram, Wei, & Jadcherla, 2015). Se ha visto que esta diferencia en la ganancia de peso en la infancia, puede ser eliminada a través del uso de ambientes enriquecidos, es decir la estimulación cerebral por parte de su entorno físico (Kiss et al., 2013). Sin embargo, la quercetina no parece tener un efecto sobre esta variable.

En la adolescencia y la adultez esta diferencia se pierde, y todos los grupos presentan una ganancia de peso similar. Esta recuperación o “*catching-up*” en el crecimiento luego de la lactancia indica que el efecto de la asfixia sobre esta variable corporal es superado a lo largo del desarrollo.

Alteraciones motoras

En los trabajos de asfixia perinatal, en particular en los que utilizan el modelo de inmersión en roedores, se reportan alteración de la locomoción y/o los reflejos (revisado en Barkhuizen et al., 2017). En concordancia, en el presente trabajo encontramos que la asfixia produjo una afectación de los reflejos motores y las funciones locomotoras, evidenciado por una mayor latencia en el reflejo de enderezamiento en machos en P3, menor proporción de animales que logran completar la prueba de *gait*, mayores tiempos de desplazamiento en esta prueba machos y hembras y menor proporción de machos que logran completar la prueba de geotaxis negativa. Estos resultados son concordantes con los reportados por Kiss y col., que describieron que, tras 15 minutos de asfixia, el desarrollo del reflejo de *grasping* y de enderezamiento está retrasado 3-4 días en animales asfícticos, y el desarrollo de la geotaxis negativa, y *gait*, entre otros, está retrasado 1 a 2 días en comparación con los animales control. Además, de acuerdo con estos autores, entre los días 12 y 16, las crías asfícticas presentaron geotaxis negativa más lenta, y entre los días 8 a 12 mostraron un mayor tiempo de desplazamiento en la prueba de *gait* (Peter Kiss et al., 2009, 2013).

La administración de la quercetina revirtió el efecto de la asfixia sobre la latencia en el reflejo de enderezamiento. Sin embargo, no mostró un efecto en las restantes pruebas motoras. Esto podría deberse en parte, a que, si bien las funciones evaluadas se encuentran relacionadas al control motor, los circuitos neurales que las regulan residen en distintas áreas o vías del cerebro, cuya maduración continúa luego del nacimiento (Tilney, 1933). En este sentido, estas vías o circuitos pueden tener una susceptibilidad diferencial a la asfixia y al tratamiento con quercetina, debido a diferente plasticidad y capacidad de neurogénesis de las distintas áreas, la sensibilidad al estrés oxidativo, sensibilidad metabólica de las células, entre otros factores (Herrera-Marschitz et al., 2011).

Las diferencias encontradas desaparecen con la edad (según pudimos corroborar en el caso del reflejo de enderezamiento), lo que concuerda con estudios previos que señalan que el desarrollo tardío de los reflejos es un indicador temprano de daño neurológico (Barkhuizen et al., 2017). Esto podría explicarse por la alta plasticidad del cerebro neonatal (P. Kiss et al., 2005). Algunas evidencias sugieren la existencia de mecanismos compensatorios, donde la función de las neuronas dañadas sería llevada a cabo por otras áreas del cerebro (Kartje-Tillotson, Neafsey, & Castro, 1985; Reinoso & Castro, 1989; Towfighi, Housman, Vannucci, & Heitjan, 1994). A su vez, una mayor plasticidad del cerebro de la rata frente a la del humano, podría explicar una afectación neurológica menos severa que la observada en humanos (Lubics et al., 2005).

Alteraciones cognitivas

En humanos, los déficits cognitivos, que van desde discapacidad intelectual a desempeños académicos por debajo del promedio, son algunas de las consecuencias a largo plazo reportadas tras asfixia perinatal (van Handel, Swaab, de Vries, & Jongmans, 2007).

En el modelo de asfixia utilizado en este trabajo se han descrito déficits cognitivos, como por ejemplo los descritos por Blanco y col, que reportan afectaciones moderadas de la memoria de reconocimiento, y de la memoria espacial y de referencia a los 30 días post asfixia severa (Blanco et al., 2015). No obstante, los diferentes reportes presentes en la bibliografía en que se emplea este modelo, no

son consistentes. En el presente trabajo evaluamos la memoria olfativa en la infancia y encontramos que todos los grupos fueron capaces de recordar y reconocer el olor materno. Sin embargo, en la proporción de animales que reconoció el olor materno se observó una tendencia a la baja en el grupo AV en hembras en comparación con el grupo control, pero no así en los machos. El hecho de que en el grupo que recibió quercetina la proporción de hembras que reconocieron el olor materno fue comparable a la del grupo control podría sugerir una contribución de la quercetina en la mejora de las funciones cognitivas en estos individuos. Sería, por tanto, interesante seguir profundizando en este tipo de evaluaciones de la función cognitiva y el posible rol de la quercetina.

En concordancia con resultados obtenidos por otros autores (Simola et al., 2008; Strackx et al., 2010), no se encontraron grandes afectaciones por la asfixia en las pruebas de memoria de reconocimiento de objeto, donde nuevamente encontramos que todos los grupos fueron capaces de reconocer el objeto novedoso a corto y largo plazo, tanto en la adolescencia como en la adultez. A pesar de ello, en la adolescencia, en la prueba a largo plazo encontramos que los grupos asfícticos presentaron menores índices de reconocimiento que los grupos control, sin detectar un efecto preventivo de la quercetina. Es decir, que los animales asfícticos (inyectados o no con quercetina) tienen memoria del objeto, logran aprender y reconocer el objeto, pero aun así el índice es menor en la prueba de memoria a largo plazo, indicando que hay una afectación leve de la memoria de reconocimiento.

Barkhuizen y colaboradores, en su revisión en detalle de la investigación en este modelo de asfixia perinatal, postulan que las estructuras involucradas en la función cognitiva podrían ser más resilientes a la asfixia, en relación a las áreas asociadas a la locomoción, y que el daño a estas áreas podría ser más factible de revertir por influencias ambientales durante la vida del individuo. Esto explicaría la inconsistencia de las observaciones de los déficits cognitivos en este modelo según los distintos autores (Barkhuizen et al., 2017).

En humanos, los estados hipóxicos-isquémicos producen lesiones hipocampales y déficits de memoria subsecuentes. En el presente trabajo, se describieron cambios en el peso de hipocampo en la rata adulta. Si bien podría pensarse que esto se debiera a un menor peso corporal o cerebral en los animales asfícticos en la etapa adulta, en esta etapa no se encontraron diferencias en la ganancia de peso, o en el

peso propiamente dicho, como se mostró anteriormente. Otros autores han evaluado tanto el tamaño cerebral (Bjelke et al., 1991) como el peso cerebral (J Gross, Burgoyne, & Rose, 1981) tras la asfixia perinatal, indicando que no existen diferencias debidas a la asfixia. Por lo tanto, lo observado en nuestro caso sería un efecto específico sobre el área del hipocampo, cuyo desarrollo se completa en la etapa perinatal.

Dado que ni la asfixia ni la quercetina ejercieron acciones claras y robustas sobre las pruebas de memoria olfativa y de reconocimiento, y dadas las diferencias de peso de hipocampo en la etapa adulta que encontramos en este trabajo sería interesante evaluar la afectación de otros tipos de memoria como ser la memoria espacial que se ha visto que está fuertemente asociada a la función hipocampal. Una de las técnicas que evalúan este tipo de memoria, es el laberinto acuático de Morris, y se ha visto que es afectada por la asfixia perinatal (Blanco et al., 2015; Boksa et al., 1995; Galeano et al., 2015). En particular, Qu y colaboradores analizaron el desempeño en el laberinto acuático de Morris en un modelo de isquemia en ratas neonatas que recibieron quercetina por vía intragástrica, demostrando que la quercetina mejora el aprendizaje espacial (Qu et al., 2014).

Alteraciones emocionales

Las vocalizaciones ultrasónicas de las crías de rata al ser separadas de sus madres, se han postulado como homólogas al llanto de los bebés humanos (Zeskind et al., 2011). Estos llamados sirven para alertar a las madres roedoras de la necesidad de cuidado de sus crías y para facilitar su ubicación. La cantidad de vocalizaciones es baja después del nacimiento y aumenta hasta su pico en los días P11-P12. En la prueba de potenciación maternal, justamente se toma este parámetro, el número de ultravocalizaciones, para evaluar la respuesta de distrés de las crías ante una separación de la madre (Groenink et al., 2008). En nuestro caso, en esta prueba todos los grupos presentaron el comportamiento de potenciación, y no hubo diferencias significativas en el número de ultravocalizaciones en cada uno de los aislamientos, entre los diferentes grupos experimentales.

Si bien estos resultados concuerdan con los obtenidos por Venerosi y colaboradores (Venerosi et al., 2006), Calamandrei et al. observaron diferencias significativas en el patrón de emisión de las ultravocalizaciones, pero no en el número, durante un único

aislamiento de 3 minutos: el número de USV fue menor durante el primer minuto en los animales asfícticos y mayor en los minutos siguientes en comparación con el control (Calamandrei et al., 2004). Si bien este enfoque no fue utilizado en nuestro trabajo, sería interesante en estudios posteriores evaluar posibles diferencias en el patrón de emisión de USV entre crías asfícticas y controles.

Lo interesante de esta prueba es que encontramos diferencias de comportamiento, no en los aislamientos, sino durante el período de interacción con la madre. Dado que no se encontraron diferencias en parámetros que se correlacionan con el cuidado maternal brindado (olfateos, lamidos y acarreos), las diferencias parecen explicarse por un estado emocional diferencial en las crías, y no resultante de diferente cuidado maternal hacia un grupo u otro. A su vez, encontramos que el efecto varía de acuerdo al sexo, los machos AV mostraron una tendencia a un mayor número de vocalizaciones que el grupo CV ($p=0,1$), mientras que las hembras AV parecerían emitir menor número de ultravocalizaciones en comparación con el grupo CV ($p<0,5$). La quercetina parecería afectar este parámetro en los animales asfícticos, ya que, tanto en hembras como en machos, el número de ultravocalizaciones en el grupo AQ es similar al grupo CQ ($p=NS$). Sería importante por lo tanto profundizar en estos hallazgos, mediante la utilización de pruebas comportamentales adicionales que evalúen más detalladamente el estado emocional y el comportamiento social. En este sentido Vázquez-Borsetti y colaboradores describieron que los animales sometidos a asfixia mostraban menor comportamiento de juego (play soliciting behavior) durante la interacción social, y que dicho comportamiento no estaba relacionado con un aumento general de la ansiedad en la prueba de campo abierto (Vázquez-Borsetti et al., 2016).

La prueba de campo abierto (Walsh & Cummins, 1976), evalúa no solo locomoción, sino también exploración (curiosidad) y miedo o ansiedad (Belzung & Griebel, 2001; Russell, 1973). Una alta frecuencia de cruces y de posturas erguidas o "rearings" indica una mayor locomoción y exploración, y un menor nivel de ansiedad. El número de entradas o cruces en el área central, y el tiempo en el área central son medidas de comportamiento exploratorio y de ansiedad. Una alta frecuencia/duración de estos parámetros en el área central indica alto nivel de exploración y bajos niveles de ansiedad ("The Open Field Test," 2004).

El hecho de que en la adolescencia el grupo AV presentó una tendencia a realizar mayor número de “rearings” en comparación con CV podría indicar un aumento de la actividad exploratoria de la asfixia en esta etapa de la vida del individuo. Si bien no significativas estadísticamente, las comparaciones indicaron que el número de rearings en el grupo AV es mayor que en el AQ y mayor que en los controles, sugiriendo un menor nivel de ansiedad. Estos datos no concuerdan con los obtenidos por otros autores que han reportado niveles mayores de ansiedad a los 2-3 meses de edad en pruebas de campo abierto y laberinto en cruz elevado (Allende-Castro et al., 2012; Paola Morales et al., 2010).

En la adultez, también observamos un efecto en la locomoción y actividad exploratoria, pero en este caso evidenciado por un menor número de cruces en la periferia en el grupo AV en comparación con el grupo control. En el grupo AQ, observamos también una disminución en comparación con el grupo CQ, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Numerosos trabajos reportan un cambio en la actividad exploratoria y locomoción. Sin embargo, los resultados no son consistentes, variando en función de la edad, el sexo y la severidad de la asfixia (revisado en Barkhuizen et al., 2017).

En base a estos resultados la prueba de campo abierto deja abierta una interrogante acerca del efecto tanto de la asfixia como de la quercetina sobre la ansiedad en distintas edades y en relación con la locomoción. Una de las desventajas de esta prueba es la dificultad para disociar una supresión de la actividad exploratoria inducida por ansiedad, de una disminución de la actividad locomotora en general. Para abordar este problema se podrían realizar otras pruebas comportamentales que también evalúen ansiedad experimental.

El uso de modelo animales para la evaluación de afectaciones emocionales puede ser útil para establecer la contribución de la asfixia perinatal en la predisposición a trastornos neurocomportamentales, dado que, las complicaciones obstétricas, y en particular la asfixia perinatal se han asociado a patologías neuropsiquiátricas y neurocomportamentales como déficit atencional con hiperactividad, autismo, o esquizofrenia (C Dalman, Allebeck, Cullberg, Grunewald, & Köster, 1999; Christina Dalman et al., 2001; Rapoport, Addington, Frangou, & Psych, 2005; Sullivan & Brake, 2003).

Diferencias entre sexos

De acuerdo a la bibliografía, históricamente se ha propuesto que los machos son más sensibles al daño hipóxico-isquémico (Naeye, Burt, Wright, Blanc, & Tatter, 1971). La hipótesis conocida como “Male disadvantage hypothesis”, que plantea una mayor mortalidad y morbilidad perinatal en machos que en hembras, se ha reconfirmado más recientemente para neonatos humanos, y se ha demostrado también en adultos, y en otras especies como la rata (Gibson, 2013; Kirchengast Beda, 2009; C. Fabian Loidl et al., 2000). Por ejemplo, Loidl y colaboradores encontraron una mayor mortalidad en machos que en hembras tras un evento de asfixia perinatal, y a su vez, los machos presentaron diferente actividad locomotora en la prueba de campo abierto a los 45 días de vida, pero no así las hembras (C. Fabian Loidl et al., 2000).

En cierta medida, nuestros resultados se contraponen a la hipótesis “Male disadvantage hypothesis” y ponen de manifiesto diferentes patrones de susceptibilidad al daño neurológico producido por la asfixia de acuerdo al sexo. Por un lado, los machos serían más sensibles a la afectación de los reflejos motores, mientras que en las hembras vimos una mayor afectación de la memoria olfativa. También observamos diferente efecto de la asfixia en el número de ultravocalizaciones durante la interacción materna según el sexo de la cría. Por otro lado, no encontramos diferencias en la mortalidad entre machos y hembras. En base a estos resultados, podríamos decir que existen diferencias en los patrones de daño que la asfixia desencadena en uno u otro sexo, pero no aventuraríamos a decir que un sexo es más sensible o se ve más gravemente afectado que el otro.

Los mecanismos por los que el sexo influenciarían la mortalidad y las funciones neurológicas tras la asfixia se desconocen. Sin embargo, existen áreas del cerebro que son sexualmente dimórficas y podrían jugar un rol importante en la diferente susceptibilidad al daño en determinadas áreas o funciones neuronales específicas en los distintos sexos (Becker, 1990). A su vez, los niveles de hormonas sexuales circulantes también podrían participar del establecimiento de estos patrones de daño diferenciales (Alkayed et al., 1998; Y. Q. Zhang, Shi, Rajakumar, Day, & Simpkins, 1998).

Evaluación de perfiles proteicos diferenciales

Para lograr entender los mecanismos de acción que subyacen a los numerosos efectos neuroprotectores de la quercetina, es necesario conocer cómo este compuesto afecta la expresión génica, y qué vías específicas modula. En este sentido, el abordaje proteómico constituye un abordaje práctico y sin preconceptos para interrogar los blancos de la acción de la quercetina. De este estudio se desprende que tanto la asfixia como el tratamiento con quercetina afectan simultáneamente a una multitud de procesos celulares (metabolismo, desarrollo, transmisión nerviosa, respuesta al estrés, etc).

Nuestro grupo de trabajo realizó previamente un estudio proteómico preliminar en el modelo de asfixia en cerdo recién nacido utilizado por Blasina y colaboradores. El presente estudio proteómico aporta datos más contundentes, ya que se realizó por una técnica de mayor resolución y reproducibilidad (2D-DIGE), y se ensayó en un número de individuos mayor (N=4 para cada condición). Ambos trabajos coinciden en algunos de los procesos biológicos encontrados como el metabolismo y el citoesqueleto, pero difieren en otros. Un caso a mencionar es el de proteínas relacionadas a la actividad antioxidante. En el trabajo realizado en cerdo encontramos numerosas proteínas con actividad antioxidante como la superóxido dismutasa, peroxiredoxina 3, y Glutathion S-transferasa P (Cardozo, 2014). Sin embargo, en el modelo de la rata no encontramos proteínas con función antioxidante, lo que concuerda con la falta de evidencias significativas de protección contra el daño oxidativo tras el tratamiento con quercetina discutido anteriormente.

En el caso de la asfixia notamos que ésta regula la expresión tanto positiva como negativamente. En el caso de la regulación negativa, puede deberse a la respuesta adaptativa de la célula de apagado o *shut down* de procesos que consumen energía, entre ellos la síntesis proteica y la síntesis de nucleótidos, por ejemplo, mediante la disminución de la expresión del factor de traducción Elongation factor 2 y la transcetolasa referidas en este trabajo. Aquellos casos en los que la quercetina aumenta o disminuye la expresión restituyendo los niveles normales, como es el caso de la enolasa, piruvato quinasa o la malato deshidrogenasa, podrían estar evidenciando el efecto protector de este flavonoide. Más aún, las proteínas cuya expresión se vio afectada únicamente por el tratamiento con quercetina, y no por la asfixia (dihydropyrimidinase-related protein 2, serine/threonine-protein phosphatase

2A 65 kDa regulatory subunit A alpha, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, POTE ankyrin domain family member F isoform X2) podrían revelar procesos celulares sobre los que actúa la quercetina.

Se ha establecido que la asfixia perinatal causa anomalías sinápticas y de señalización en varias regiones del sistema nervioso, entre las cuales se encuentran el hipocampo, estriado, núcleo accumbens y amígdala (Barkhuizen et al., 2017). En este modelo de asfixia, estas anomalías incluyen alteraciones de los sistemas dopaminérgicos como cambios en los niveles de dopamina (Bustamante et al., 2003; Y Chen et al., 1997; Laplante, Brake, Chehab, & Sullivan, 2012; Ungethüm et al., 1996), cambios en los niveles de tirosina hidroxilasa y de receptores de dopamina (Bjelke et al., 1991; B. El-Khodor & Boksa, 2001; B. F. El-Khodor, Flores, Srivastava, & Boksa, 2004; J Gross et al., 2000; Johann Gross et al., 2005). Además, se ha visto alteración de la transmisión gabaérgica y glutamatérgica en diferentes áreas (corteza, hipocampo, estriado, núcleo accumbens, núcleo olfatorio anterior, entre otras) con niveles alterados de GABA y glutamato (Y Chen et al., 1997; Frizzo et al., 2010; C.F. Loidl et al., 1994), así como cambios en la expresión de receptores AMPA, NMDA y kainato (B. F. El-Khodor et al., 2004). En nuestro análisis proteómico, encontramos que la quercetina modula la expresión de proteínas vinculadas a la sinapsis glutamatérgica y dopaminérgica, lo cual podría constituir un posible mecanismo de acción de la actividad protectora de la quercetina, ya que esta modulación de la expresión podría estar compensando las alteraciones de la asfixia sobre estos sistemas de transmisión nerviosa.

Es probable que, junto a la regulación positiva o negativa de la expresión, se estén dando modificaciones postraduccionales que regulen la actividad de las proteínas identificadas. Posiblemente sea el caso de aquellas proteínas que se encontraron en más de un spot (heat shock 70 kDa protein 4, serotransferrin, transketolase, ankyrin domain family member F isoform X1, alpha enolase, POTE ankyrin domain family member F isoform X2, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K). Por ello, son necesarios otros ensayos como Western Blot para confirmar los cambios observados, o técnicas de qPCR para estudiar niveles de expresión a nivel transcripcional y evidenciar posibles formas de splicing u otros análisis proteómicos que permitan identificar dichas modificaciones postraduccionales.

A continuación, se discuten algunas de las proteínas identificadas.

α -enolasa. Las enolasas son muy importantes para la generación de energía durante la glicólisis y en particular en el metabolismo energético del cerebro. La sobreexpresión de enolasas promueve el crecimiento en cultivos neuronales (Hattori, Takei, Mizuno, Kato, & Kohsaka, 1995; Takei et al., 1991). Además, se ha descrito que su sobreexpresión mejora la supervivencia neuronal y regeneración del crecimiento axonal, y consecuentemente actúa como un agente neurotrófico (Annapurna, Ansari, & Manjunath, 2013; Rogerio et al., 2007). La regulación negativa de su expresión lleva a la neurodegeneración (Hafner, Obermajer, & Kos, 2012), y en el presente trabajo observamos una disminución de la expresión de esta proteína tras la asfixia, mientras que tras el tratamiento con quercetina los valores son similares al control, por lo que la restitución de los niveles basales de la expresión de la enolasa que observamos podría estar relacionado con el efecto neuroprotector de la quercetina.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. Respecto a hnRNPK encontramos que la asfixia disminuye levemente sus niveles de expresión, mientras que la quercetina aumenta significativamente los niveles basales. Por ello, podríamos considerar que esta proteína puede estar jugando un rol preponderante en los mecanismos de protección de la quercetina. La familia hnRNP comprende a más de 20 miembros, cuyas funciones principales son el empaquetamiento de transcritos nacientes, procesamiento alternativo y regulación traduccional. Las hnRNPs generalmente comparten la función de transporte entre el núcleo y el citoplasma del ARNm procesado (Ping Han, Hang Tang, & Smith, 2010). De confirmarse la disminución de los niveles de expresión de esta proteína podría indicar que la exportación nuclear durante la asfixia se ve afectada, si bien esta comparación no fue estadísticamente significativa. Weitzdörfer y colaboradores reportaron una disminución en los niveles de hnRNPD en este mismo modelo de asfixia (Weitzdörfer, Höger, Burda, Pollak, & Lubec, 2008). De acuerdo con Chen y colaboradores, el miembro hnRNPA1 de esta familia de proteínas se une directamente con la quercetina, y esta interacción causaría su acumulación en el núcleo (Ko et al., 2014). Estos datos hacen de esta familia de neuroproteínas, candidatos especialmente interesantes para su estudio, y lograr elucidar el posible rol mediador del daño y/o la protección en este modelo.

Elongation factor 2. La traducción puede ser regulada a nivel de la iniciación o la elongación. La regulación a nivel de la elongación generalmente involucra la inhibición del factor EF-2. Esta proteína es una translocasa dependiente de GTP responsable del movimiento del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P del ribosoma (Hizli

et al., 2013). Su actividad es regulada por fosforilación y se ha visto que es fosforilada en respuesta a la hipoxia (Althausen et al., 2001). En el presente trabajo encontramos que la asfixia indujo una disminución de su expresión. Es decir, que la disminución de la expresión de EF-2 podría constituir uno de los mecanismos por lo que las células bloquean la síntesis proteica como parte de la respuesta adaptativa celular conservada a este tipo de daño. La quercetina tendió a restablecer los niveles de EF-2, pudiendo indicar que la síntesis proteica se restituye antes con el tratamiento con quercetina. No encontramos en la bibliografía vinculación entre estas dos moléculas, sin embargo, se ha demostrado la interacción directa entre EF-1 y la quercetina (Ko et al., 2014). En otro estudio se encontró que la quercetina impide la unión del factor EF-1 al ribosoma, pero no la del EF-2 (Marcinkiewicz, Gałasiński, & Gindzieński, 1995), por lo que los mecanismos por los que la quercetina regula la actividad de estos dos factores de elongación son diferentes.

Dihydropyrimidinase-related protein 2. Una proteína que vale la pena destacar es dihydropyrimidinase-related protein 2, también conocida como Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2). Esta es una proteína citoplasmática que se expresa en forma abundante en el tejido cerebral, cumple diversas funciones neuronales incluyendo polarización neuronal, crecimiento axonal y diferenciación neuronal (Inagaki et al., 2001; Quinn, Gray, & Hockfield, 1999). Notablemente, la inducción o inhibición de su expresión se han asociado a condiciones neurológicas patológicas como son afectación de la potenciación a largo plazo (Su et al., 2007), afectación del aprendizaje espacial y la memoria (Su et al., 2007), enfermedad de Alzheimer's (Uchida et al., 2005), lesiones retinales (Cnops, Hu, Eysel, & Arckens, 2007), injurias cerebrales traumáticas y neurotóxicas (Kobeissy et al., 2006; Z. Zhang et al., 2007), así como toxicidad glutamatérgica, e isquemia cerebral (Hou et al., 2009; X. Hu, Rea, Wiktorowicz, & Perez-Polo, 2006).

CRMP2 es una fosfoproteína que puede ser fosforilada en múltiples sitios por diferentes kinasas para regular su actividad, la fosforilación la inactiva, mientras que la defosforilación la activa. De hecho, varios autores han descrito una hipofosforilación en distintos modelos de hipoxia-isquemia (Sato et al., 2011; Y. Wang, Wang, Xie, Li, & Wang, 2017; Zhou et al., 2008), aunque otros autores han descrito hiperfosforilación (Hou et al., 2009). Otros estudios han descrito ambos fenómenos, de forma dependiente del tiempo (Xiong et al., 2012). Asimismo, se ha visto que, en determinadas situaciones patológicas, como la isquemia cerebral,

CRMP2 es degradada en proteínas de 55 y 62 KDa por proteólisis por calpaína (Z. Zhang et al., 2007). Más aún, se ha demostrado que este clivaje es deletéreo para las neuronas y que la disminución del clivaje de CRMP2 por calpaína podría reducir la injuria isquémica y aumentar la sobrevivencia neuronal (Bu et al., 2011; Yin et al., 2013).

En el presente trabajo encontramos una disminución de la expresión de CRMP2 a las 5 horas luego de la asfixia, y un aumento de su expresión con el tratamiento con quercetina. La disminución podría explicarse entonces por el clivaje proteolítico de esta proteína, y la quercetina podría actuar impidiendo este clivaje directa o indirectamente. Sin embargo, no es posible descartar que estemos detectando una de las formas hipo o hiperfosforiladas y que ello se relacione con cambios en la actividad de esta proteína. Nuestros datos contrastan con los obtenidos por Shah y colaboradores, quienes encontraron un aumento en la expresión de esta proteína con la isquemia, y niveles basales de expresión en el grupo que recibió quercetina en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (F.-A. Shah, Park, & Koh, 2018). Sin embargo, la discrepancia se puede explicar por las diferencias en el diseño y estrategia experimental donde se utilizan modelos diferentes (isquemia vs asfixia), en edades diferentes (adulto vs neonato) y la expresión es evaluada a diferentes tiempos (24 hs vs 5 hs).

Ciertamente, esta proteína constituye un buen candidato para su estudio como posible mecanismo efector de la acción neuroprotectora de la quercetina, y más estudios son necesarios para determinar el rol que juega tanto en el daño asfíctico como en la neuroprotección, y para describir cuáles son los fenómenos asociados, de clivaje o de fosforilación en este contexto, que regulan su actividad.

Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform. La fosfatasa 2A (PP2A) está formada por tres subunidades: una subunidad catalítica (C), una subunidad de unión a sustrato (B) y una subunidad de “scaffold” (A) que es fundamental para el ensamblaje de la fosfatasa, ya que une a la subunidad C y la subunidad B y las acerca, constituyendo así a la fosfatasa. En este trabajo encontramos que la quercetina induce una disminución de la expresión de la subunidad A α . La fosfatasa 2A, puede regular muchas vías de señalización al defosforilar numerosas moléculas críticas en la señalización como son AKT, p53, c-Myc, y β -catenina, modulando así procesos celulares, como regulación del ciclo celular, transducción de señales, proliferación celular, muerte celular programada (P.

M. Chen et al., 2017; Van Hoof & Goris, 2003). Se ha demostrado que PP2A es un regulador de la familia de proteínas Bcl-2, así como un regulador negativo de la proteína kinasa IV dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMK IV) involucrada en la regulación del elemento de respuesta a AMPc (CREB), un factor de transcripción fundamental en la muerte celular programada (Van Hoof & Goris, 2003).

Se ha visto que PP2A juega un rol en diferentes mecanismos neuroprotectores y respuestas celulares a insultos neuronales (Beattie et al., 2000; Belmeguenai & Hansel, 2005; Hedou et al., 2008; Yi & Simpkins, 2008). Además, contribuye a la modulación de la neurotransmisión excitatoria y de procesos de aprendizaje y memoria a través de una variedad de mecanismos intracelulares (Belmeguenai & Hansel, 2005; J. W. Lin et al., 2000; Mulkey, Herron, & Malenka, 1993), incluyendo la modulación directa de receptores AMPA (Launey, Endo, Sakai, Harano, & Ito, 2004).

Varios estudios han descrito la participación de esta familia de fosfatasa en los mecanismos celulares inducidos por isquemia en el cerebro (Rundén et al., 1998; Su et al., 2007; Yi & Simpkins, 2008), y en particular se ha visto vinculada directamente a los mecanismos efectores de ciertos neuroprotectores. Por ejemplo, se demostró que PP2A juega un rol en la neuroprotección mediada por estrógeno en el modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (Yi & Simpkins, 2008). Por otro lado, otros autores han postulado que la protección establecida por el compuesto propofol es mediada por la disminución en la expresión y/o en la actividad de PP2A. Por un lado, Zhu y colaboradores demostraron que la disminución en la expresión de PP2A inducida por el propofol mejora la inflamación endotelial inducida por hipoxia/reoxigenación en un modelo *in vitro* (Zhu et al., 2015). Por otro lado, Lu y colaboradores demostraron, en un modelo que mimetiza la hipoxia mediante el tratamiento con CoCl₂, que el propofol protegió a las células hipocámpales HT22 de la injuria celular y de las apoptosis mediante disminución en la expresión de PP2A, lo que llevaría a la expresión aumentada de la proteína antiapoptótica Bcl-2, revirtiendo la viabilidad celular (Lu et al., 2017).

En el presente trabajo encontramos que la quercetina disminuye significativamente la expresión de la subunidad A α de la fosfatasa 2A, la cual es indispensable para el ensamblaje del complejo funcional de esta fosfatasa, por lo que niveles disminuidos de esta subunidad se espera que repercutan en menores niveles de la fosfatasa funcional (Activa o inactiva). En base a la bibliografía podríamos postular a esta

fosfatasa como un nuevo candidato a ser evaluado en la búsqueda de la elucidación de los mecanismos efectores de la quercetina. Siendo éste un candidato aparentemente novedoso, dado que no encontramos vinculación en la bibliografía entre nuestro compuesto de interés y dicha proteína.

Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform. Esta proteína es una subunidad de la fosfatasa 3, también conocida como fosfatasa 2B, o más comúnmente como calcineurina. Es una fosfatasa ampliamente distribuida, conservada, con una gran expresión a nivel cerebral, y cuya actividad es regulada por calcio y calmodulina (Joseph et al., 1998; Klee, Crouch, & Krinks, 1979; Y. V. Liu et al., 2007). Esta enzima es un heterodímero conformado por una subunidad catalítica, y una subunidad reguladora de unión a calcio. La calcineurina está involucrada en múltiples procesos celulares (como activación de células T) y controla la síntesis de citoquinas mediante la defosforilación de una familia de factores de transcripción llamados NF-ATs (por su nombre en inglés nuclear factor of activated T cells). Por otro lado, se ha visto que un aumento en la actividad de la calcineurina promueve la expresión de HIF-1 α (Y. V. Liu et al., 2007; Walczak-Drzewiecka, Ratajewski, Wagner, & Dastych, 2008). HIF-1 es el factor inducible por hipoxia 1, un mediador crucial de las respuestas adaptativas a baja disponibilidad de oxígeno, a través de la regulación transcripcional de proteínas requeridas para el transporte de oxígeno y el metabolismo energético (C.-J. Hu, Wang, Chodosh, Keith, & Simon, 2003). En el presente trabajo encontramos que la quercetina aumenta los niveles de expresión de la subunidad catalítica de esta fosfatasa, lo que podría llevar a un aumento de la expresión de HIF-1 α , siendo este un posible mecanismo de protección. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la quercetina inhibe la actividad de la calcineurina, con efectos inmunosupresores asociados en modelos en cultivo, y en un modelo de tumor de mama (Lei et al., 2011; H. Wang, Zhou, Lei, & Wei, 2010; X. Zhao et al., 2016; Y. Zhao et al., 2016), por lo que sería de interés evaluar directamente el nivel de actividad de esta enzima en el contexto de asfixia perinatal.

Pyruvate kinase. Esta enzima participa del metabolismo glicolítico, mediante la transferencia de un grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato a ADP, con la producción de ATP y piruvato, por lo que es considerada una enzima esencial en la glicólisis (Gupta & Bamezai, 2010). De acuerdo con nuestros resultados habría un aumento en la expresión de esta enzima tras el evento asfíctico, resultados que concuerdan con los de otros autores en células en cultivo (Ptashne, Allan, & Robil,

1985; Shimizu, Uehara, & Nomura, 2004) y en modelos de isquemia/reperfusión (Boin, Silva, Souza, Santos, & Leonardi, 2006). Este aumento en la expresión de la piruvato quinasa se debe a que esta enzima es uno de los blancos de activación de la transcripción de HIF-1 (Luo et al., 2011; Shimizu et al., 2004). La sobreexpresión de esta enzima *in vitro* conferiría resistencia a las células frente a la injuria hipóxica (Shimizu et al., 2004). Además, el tratamiento con piruvato ejerce efectos neuroprotectores frente a un trauma cerebral (Ryou et al., 2012; Zlotnik et al., 2012). Por otra parte, varios flavonoides, incluida la quercetina, tendrían un efecto inhibitorio sobre la piruvato quinasa, evaluado en condiciones *in vitro* (Aslan, Guler, & Adem, 2016). En este trabajo encontramos una disminución de la expresión de esta enzima tras el tratamiento con quercetina. En base a esta información podríamos concluir que esta regulación negativa podría constituir una situación detrimental, y no neuroprotectora de la quercetina. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que quizás los efectos beneficiosos de la quercetina por otros mecanismos de acción hayan hecho innecesario el aumento en la expresión de esta proteína, o que hayan generado un retorno a los niveles basales más rápidamente.

Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha. Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, componentes que median la señalización intracelular de los receptores acoplados a proteína G. Una vez activadas, las proteínas G heterotriméricas se disocian en dos moléculas funcionales: el monómero $G\alpha$ unido a GTP, y el dímero $G\beta\gamma$, ambos se unen y activan diferentes proteínas efectoras río abajo (Oldham & Hamm, 2008). En base a la homología de secuencia y la similaridad de funciones de las subunidades α , las proteínas G se dividen en 4 clases: G_s , G_i/o , G_q and $G_{12/13}$ (He, Neves, Jordan, & Iyengar, 2006). G_o es una de las proteínas más abundantes en el tejido cerebral y juega funciones críticas de regulación de la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión en la función y el desarrollo cerebral (Nakamura et al., 2013).

En el presente trabajo encontramos que la quercetina produce una disminución en la expresión de la subunidad α de la proteína G_o . La relación entre $G\beta\gamma$ y $G\alpha$ es crítica en mediar la transducción de señales de ciertos receptores y efectores en la membrana celular. Naragoni y colaboradores plantean que algunos fitoestrógenos, como el coumestrol y Genisteina, iniciarían la actividad transcripcional en las células mediante el control de la relación $\beta\gamma/\alpha$. Un cambio en esta relación de subunidades podría potencialmente cambiar la ejecución de estímulos iniciados a nivel de la

membrana celular a través de los receptores acoplados a proteína G (Naragoni, Sankella, Harris, & Gray, 2009).

Es evidente que la asfixia perinatal afecta una multiplicidad de procesos y funciones celulares, por lo que los tratamientos con sustancias farmacológicas y terapéuticas con acciones amplias, y diversas, como la quercetina, podrían constituir un abordaje de gran eficacia. El enfoque proteómico permitió, por tanto, identificar algunas de las vías y procesos que son regulados por la asfixia y el tratamiento con quercetina, y nos proporcionó nuevos candidatos a ser evaluados para elucidar el rol que juegan en los mecanismos de daño y/o protección.

Conclusiones

En el presente trabajo nos propusimos evaluar la capacidad neuroprotectora de la quercetina en un modelo de asfixia en ratas neonatas, con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos de daño y de protección en este contexto. El abordaje utilizado nos permitió:

- Confirmar el acceso al cerebro del preparado nanosomal administrado por vía intraperitoneal e intranasal.
- Evidenciar el efecto positivo del tratamiento con quercetina en la sobrevivencia de los animales asfícticos.
- Describir los cambios que la asfixia produce sobre parámetros comportamentales tanto locomotores como cognitivos y emocionales.
- Demostrar que la quercetina logró revertir el déficit en el reflejo de enderezamiento en machos, mostrar tendencia a mejorar la memoria olfativa en hembras y reestableció el número de ultravocalizaciones en machos y hembras durante la interacción materna, así como la actividad locomotora y de exploración en machos durante la prueba de campo abierto.
- Evaluar las propiedades antioxidantes y antiapoptóticas de la quercetina en este modelo, encontrando efectos leves.
- Identificar mediante un abordaje proteómico posibles blancos de acción del tratamiento con quercetina, relacionados con la señalización celular, la regulación traduccional, la transmisión sináptica y el guiado axonal, entre otros.

Perspectivas

Más allá de las contribuciones del presente trabajo a la comprensión de los mecanismos efectores de la quercetina que median su neuroprotección, aún quedan muchas preguntas por responder.

Respecto a la biodisponibilidad sería muy informativo evaluarla en animales asfícticos, ya que la asfixia podría determinar cambios en sus niveles o en su dinámica temporal.

Por un lado, sería de gran interés evaluar los niveles de muerte celular a distintas edades, y ahondar en los diferentes mecanismos de muerte celular presente, no sólo en la apoptosis. A su vez, sería informativo incluir otras áreas del cerebro que sabemos que tienen una especial susceptibilidad al daño asfíctico, y que no fueron incluidos en el presente trabajo, como estriado y cerebelo, entre otros. En este aspecto sería interesante estudiar este parámetro a los 70 días postnatales, y ver cómo se relaciona con los resultados respecto al peso del hipocampo, obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, es necesaria la confirmación y profundización de los resultados obtenidos con 2D-DIGE por otras técnicas específicas como Western Blot para confirmar los cambios en los niveles proteicos, identificar isoformas y/o estados de fosforilación, PCR en tiempo real para evaluar la expresión a nivel transcripcional, así como otros ensayos que evalúan actividad e interacción, entre otros.

Además, se podrían complementar los resultados obtenidos en la evaluación de las alteraciones neurocomportamentales que provoca la asfixia, y el establecimiento del efecto de la quercetina sobre los mismos, mediante la realización de pruebas de memoria espacial (por ejemplo, el laberinto acuático de Morris), realización de pruebas de ansiedad adicionales (como el laberinto en cruz elevado), y pruebas de interacción social, entre otros.

El preparado de quercetina ensayado es por tanto una estrategia prometedora, sin embargo, sería interesante evaluar si la reiteración del tratamiento a diferentes tiempos luego de la asfixia profundiza los efectos observados en este proyecto, dado que los mecanismos que generan el daño neurológico debido a la asfixia constituyen procesos que perduran y se extienden en el tiempo más allá del evento inicial. Otro

punto a evaluar es la posibilidad de efectos sinérgicos en la combinación de terapias como la hipotermia controlada.

Bibliografía

- Ader, P., Wessmann, A., & Wolfram, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(7), 1056–1067. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832067>
- Alkayed, N. J., Harukuni, I., Kimes, A. S., London, E. D., Traystman, R. J., & Hurn, P. D. (1998). Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*, 29(1), 159–65; discussion 166. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445346>
- Allende-Castro, C., Espina-Marchant, P., Bustamante, D., Rojas-Mancilla, E., Neira, T., Gutierrez-Hernandez, M. A., ... Herrera-Marschitz, M. (2012). Further Studies on the Hypothesis of PARP-1 Inhibition as a Strategy for Lessening the Long-Term Effects Produced by Perinatal Asphyxia: Effects of Nicotinamide and Theophylline on PARP-1 Activity in Brain and Peripheral Tissue. *Neurotoxicity Research*, 22(1), 79–90. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9310-2>
- Althausen, S., Mengesdorf, T., Mies, G., Oláh, L., Nairn, A. C., Proud, C. G., & Paschen, W. (2001). Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of Neurochemistry*, 78(4), 779–787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520898>
- Annapurna, A., Ansari, M. A., & Manjunath, P. M. (2013). Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(4), 491–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467948>
- Arredondo, M. ., Blasina, F., Echeverry, C., Morquío, A., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J. ., ... Dajas, F. (2004). Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2003.11.012>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Aslan, E., Guler, C., & Adem, S. (2016). *In vitro* effects of some flavonoids and phenolic acids on human pyruvate kinase isoenzyme M2. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(2), 314–317. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1022173>
- Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Higashio, H., & Terao, J. (2002). Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1706–1712. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879062>
- Azzopardi, D. (2010). Clinical management of the baby with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, 86(6), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.008>
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Serpeloni, J. M., Angeli, J. P. F., Rocha, B. A., de Oliveira Souza, V. C., ... Barbosa, F. (2011). Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Archives of Toxicology*, 85(9), 1151–1157. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0652-y>
- Barkhuizen, M., van den Hove, D. L. A., Vles, J. S. H., Steinbusch, H. W. M., Kramer, B. W., & Gavilanes, A. W. D. (2017). 25 Years of Research on Global Asphyxia in the Immature Rat Brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 75, 166–182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.042>
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., & Malenka, R. C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1291–1300. <https://doi.org/10.1038/81823>
- Becker, J. B. (1990). Direct effect of 17 β -estradiol on striatum: Sex differences in dopamine release. *Synapse*, 5(2), 157–164. <https://doi.org/10.1002/syn.890050211>
- Belmeguenai, A., & Hansel, C. (2005). A role for protein phosphatases 1, 2A, and 2B in cerebellar long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(46), 10768–10772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2876-05.2005>
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 141–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682105>
- Bencokova, Z., Kaufmann, M. R., Pires, I. M., Lecane, P. S., Giaccia, A. J., & Hammond, E. M. (2009). ATM Activation and Signaling under Hypoxic Conditions. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2), 526–537. <https://doi.org/10.1128/MCB.01301-08>
- Bischoff, S. C. (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical*

- Nutrition and Metabolic Care*, 11(6), 733–740. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831394b8>
- Bjelke, B., Andersson, K., Ogren, S. O., & Bolme, P. (1991). Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res*, 543, 1–9.
- Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M. I., Romero, J. I., Logica, T., Rivera, P., ... Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 141. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00141>
- Blasina, F., Vaamonde, L., Silvera, F., Tedesco, A. C., & Dajas, F. (2015). Intravenous nanosomes of quercetin improve brain function and hemodynamic instability after severe hypoxia in newborn piglets. *Neurochemistry International*, 89, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.007>
- Boin, I. de F. S. F., Silva, O. de C. e, Souza, M. E. J. de, Santos, A. C., & Leonardi, L. S. (2006). Pyruvate kinase activation and lipoperoxidation after selective hepatic ischemia in Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, 21 Suppl 1(Suplemento 1), 19–23. <https://doi.org/S0102-86502006000700005> [pii]
- Boksa, P., Krishnamurthy, A., & Brooks, W. (1995). Effects of a Period of Asphyxia during Birth on Spatial Learning in the Rat. *Pediatric Research*, 37(4), 489–496. <https://doi.org/10.1203/00006450-199504000-00018>
- Bu, X., Zhang, N., Yang, X., Liu, Y., Du, J., Liang, J., ... Li, J. (n.d.). Proteomic analysis of cPKC β II-interacting proteins involved in HPC-induced neuroprotection against cerebral ischemia of mice. *Journal of Neurochemistry*, 117(2), 346–356. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07209.X>
- Bustamante, D., Goigny, M., Åström, G., Gross, J., Andersson, K., & Herrera-Marschitz, M. (2003). Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia monoamine systems in the rat. *Experimental Brain Research*, 148(2), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00221-002-1304-5>
- Calamandrei, G., Venerosi, A. P., Valanzano, A., Berardinis, M. A. de, Greco, A., Puopolo, M., & Minghetti, L. (2004). Increased Brain Levels of F2-Isoprostane Are an Early Marker of Behavioral Sequels in a Rat Model of Global Perinatal Asphyxia. *Pediatric Research* 2004 55:1, 55(1), 85. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000099774.17723.d4>
- Capani, F., Loidl, C. F., Aguirre, F., Piehl, L., Facorro, G., Hager, A., ... Pecci-Saavedra, J. (2001). Changes in reactive oxygen species (ROS) production in rat brain during global perinatal asphyxia: an ESR study. *Brain Res*, 914(1–2), 204–207. [https://doi.org/S0006-8993\(01\)02781-0](https://doi.org/S0006-8993(01)02781-0) [pii]
- Carbajal Ugarte, J. A., & Pastrana Huanaco, E. (2002). Valor predictivo de asfixia perinatal en niños nacidos de mujeres con riesgo obstétrico. *Revista Mexicana de Pediatría*, 69(1), 10–13. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/fr/revista/revista-mexicana-de-pediatria/articulo/valor-predictivo-de-asfixia-perinatal-en-ninos-nacidos-de-mujeres-con-riesgo-obstetrico>.
- Cardozo, V. 2014. Expresión de genes vinculados con la hipoxia y el daño oxidativo tras asfixia perinatal, y en respuesta a un tratamiento neuroprotector con quercetina. Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UDELAR.
- Chen, P. M., Chu, P. Y., Tung, S. L., Liu, C. Y., Tsai, Y. F., Lin, Y. S., ... Tseng, L. M. (2017). Overexpression of phosphoprotein phosphatase 2A predicts worse prognosis in patients with breast cancer: a 15-year follow-up. *Human Pathology*, 66, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.06.001>
- Chen, Y., Engidawork, E., Loidl, F., Dell'Anna, E., Goigny, M., Lubec, G., ... Herrera-Marschitz, M. (1997). Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 104(1–2), 19–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466704>
- Chen, Y., Hillefors-Berglund, M., Herrera-Marschitz, M., Bjelke, B., Gross, J., Andersson, K., & von Euler, G. (1997). Perinatal Asphyxia Induces Long-Term Changes in Dopamine D1, D2, and D3 Receptor Binding in the Rat Brain. *Experimental Neurology*, 146(1), 74–80. <https://doi.org/10.1006/EXNR.1997.6497>
- Chen, Y., Ogren, S. O., Bjelke, B., Bolme, P., Eneroth, P., Gross, J., ... Andersson, K. (1995). Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat. *Neuroscience*, 68(2), 531–538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477963>
- Cho, J.-Y., Kim, I.-S., Jang, Y.-H., Kim, A.-R., & Lee, S.-R. (2006). Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, 404(3), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.010>
- Cnops, L., Hu, T.-T., Eysel, U. T., & Arckens, L. (2007). Effect of binocular retinal lesions on CRMP2 and CRMP4 but not Dyn I and Syt I expression in adult cat area 17. *European Journal of Neuroscience*, 25(5), 1395–1401. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05395.x>
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin:

- Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2986796>
- Dajas, F., Rivera, F., Blasina, F., Arredondo, F., Echeverry, C., Lafon, L., ... Heizen, H. (2003). Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotoxicity Research*, 5(6), 425–432. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715446>
- Dalman, C., Allebeck, P., Cullberg, J., Grunewald, C., & Köster, M. (1999). Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort. *Archives of General Psychiatry*, 56(3), 234–240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078500>
- Dalman, C., Thomas, H. V., David, A. S., Gentz, J., Lewis, G., & Allebeck, P. (2001). Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 179(05), 403–408. <https://doi.org/10.1192/bjp.179.5.403>
- de Boer, V. C. J., Dihal, A. a, van der Woude, H., Arts, I. C. W., Wolffram, S., Alink, G. M., ... Hollman, P. C. H. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1718–1725. <https://doi.org/10.1093/jn/135/7/1718>
- De Lima, M. N. M., Laranja, D. C., Caldana, F., Graziotin, M. M., Garcia, V. A., Dal-Pizzol, F., ... Schröder, N. (2005). Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Experimental Neurology*, 196(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.07.017>
- Dell'Anna, E., Chen, Y., Engidawork, E., Andersson, K., Lubec, G., Luthman, J., & Herrera-Marschitz, M. (1997). Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. *Experimental Brain Research*, 115(1), 105–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224838>
- Dell'Anna, M. E., Calzolari, S., Molinari, M., Iuvone, L., & Calimici, R. (1991). Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Brain Research*, 45(2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80078-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80078-6)
- Denny Joseph, K. M., & Muralidhara. (2013). Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.PNPBP.2012.08.018>
- Denny Joseph, K. M., & Muralidhara. (2015). Combined oral supplementation of fish oil and quercetin enhances neuroprotection in a chronic rotenone rat model: relevance to Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, 40(5), 894–905. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1542-0>
- du Plessis, A. J., & Volpe, J. J. (2002). Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Current Opinion in Neurology*, 15(2), 151–157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923628>
- Edwards, A. D., Brocklehurst, P., Gunn, A. J., Halliday, H., Juszczak, E., Levene, M., ... Azzopardi, D. (2010). Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340, c363. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- El-Khodor, B., & Boksa, P. (2001). Caesarean Section Birth Produces Long Term Changes in Dopamine D1 Receptors and in Stress-induced Regulation of D3 and D4 Receptors in the Rat Brain. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 423–439. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00228-7)
- El-Khodor, B. F., Flores, G., Srivastava, L. K., & Boksa, P. (2004). Effects of birth insult and stress at adulthood on excitatory amino acid receptors in adult rat brain. *Synapse (New York, N.Y.)*, 54(3), 138–146. <https://doi.org/10.1002/syn.20073>
- Field, A. (2013). *Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics*. Sage.
- Frizzo, J. K., Cardoso, M. P., de Assis, A. M., Perry, M. L., Volonté, C., & Frizzo, M. E. (2010). Effects of Acute Perinatal Asphyxia in the Rat Hippocampus. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(5), 683–692. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9492-1>
- Fox W., 1965. Reflex ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav* 13: 234-241.
- Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T. M. A., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Rodríguez De Fonseca, F., ... Santín, L. J. (2015). Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00406>
- Ghosh, A., Sarkar, S., Mandal, A. K., & Das, N. (2013). Neuroprotective Role of Nanoencapsulated Quercetin in Combating Ischemia-Reperfusion Induced Neuronal Damage in Young and Aged Rats. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057735>
- Gibson, C. L. (2013). Cerebral ischemic stroke: Is gender important? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(9), 1355–1361. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.102>
- Glass, H. C. (2018). Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Other Neonatal Encephalopathies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 24(1), 57–71. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000557>
- Goldberg, D. M., Yan, J., & Soleas, G. J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different

- matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, 36(1), 79–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554065>
- Groenink, L., Verdouw, P. M., van Oorschot, R., & Olivier, B. (2008). Models of anxiety: Ultrasonic vocalizations of isolated rat pups. *Current Protocols in Pharmacology*, (SUPPL. 43), 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0518s43>
- Gross, J., Andersson, K., Chen, Y., Müller, I., Andreeva, N., & Herrera-Marschitz, M. (2005). Effect of perinatal asphyxia on tyrosine hydroxylase and D2 and D1 dopamine receptor mRNA levels expressed during early postnatal development in rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 134(2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.10.030>
- Gross, J., Burgoyne, R. D., & Rose, S. P. (1981). Influence of prenatal hypoxia on brain development: effects on body weight, brain weight, DNA, protein, acetylcholinesterase, 3-quinuclidinyl benzilate binding, and in vivo incorporation of [¹⁴C]lysine into subcellular fractions. *Journal of Neurochemistry*, 37(1), 229–237. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6788903>
- Gross, J., Müller, I., Chen, Y., Elizalde, M., Leclere, N., Herrera-Marschitz, M., & Andersson, K. (2000). Perinatal asphyxia induces region-specific long-term changes in mRNA levels of tyrosine hydroxylase and dopamine D(1) and D(2) receptors in rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 79(1–2), 110–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10925148>
- Gulati, I. K., Shubert, T. R., Sitaram, S., Wei, L., & Jadcherla, S. R. (2015). Effects of birth asphyxia on the modulation of pharyngeal provocation-induced adaptive reflexes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(8), G662–9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00204.2015>
- Gundimeda, U., McNeill, T. H., Elhiani, A. A., Schiffman, J. E., Hinton, D. R., & Gopalakrishna, R. (2012). Green Tea Polyphenols Precondition against Cell Death Induced by Oxygen-Glucose Deprivation via Stimulation of Laminin Receptor, Generation of Reactive Oxygen Species, and Activation of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34694–34708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356899>
- Guo, Y., & Bruno, R. S. (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.008>
- Gupta, V., & Bamezai, R. N. K. (2010). Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 19(11), 2031–2044. <https://doi.org/10.1002/pro.505>
- Ha, H. J., Kwon, Y. S., Park, S. M., Shin, T., Park, J. H., Kim, H. C., ... Wie, M. B. (2003). Quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxin-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(4), 544–546. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12673040>
- Hafner, A., Obermajer, N., & Kos, J. (2012). γ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochemical Journal*, 443(2), 439–450. <https://doi.org/10.1042/BJ20111351>
- Hall C, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology* 1932;6:1– 12.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hammond, E. M., Dorie, M. J., & Giaccia, A. J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12207–12213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212360200>
- Hattori, T., Takei, N., Mizuno, Y., Kato, K., & Kohsaka, S. (1995). Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neuroscience Research*, 21(3), 191–198. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)00849-B](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)00849-B)
- Haynes, R. L., Sleeper, L. A., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2013). Neuropathologic Studies of the Encephalopathy of Prematurity in the Late Preterm Infant. *Clinics in Perinatology*, 40(4), 707–722. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2013.07.003>
- He, J. C., Neves, S. R., Jordan, J. D., & Iyengar, R. (2006). Role of the Go/i signaling network in the regulation of neurite outgrowth. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(7), 687–694. <https://doi.org/10.1139/y06-025>
- Healthcare, G. E. (2005). Ettan DIGE System. *Application Notes*, 1–18.
- Hedou, G. F., Koshibu, K., Farinelli, M., Kilic, E., Gee, C. E., Kilic, U., ... Mansuy, I. M. (2008). Protein Phosphatase 1-Dependent Bidirectional Synaptic Plasticity Controls Ischemic Recovery in the Adult Brain. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 154–162. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4109-07.2008>
- Herrera-Marschitz, M., Morales, P., Leyton, L., Bustamante, D., Klawitter, V., Espina-Marchant, P., ... Gebicke-Haerter, P. J. (2011). Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus

- on sentinel proteins. *Neurotoxicity Research*, 19(4), 603–627. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9208-9>
- Herrera, M. I., Otero-Losada, M., Udovin, L. D., Kusnier, C., Kölliker-Frers, R., de Souza, W., & Capani, F. (2017). Could Perinatal Asphyxia Induce a Synaptopathy? New Highlights from an Experimental Model. *Neural Plasticity*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/3436943>
- Hizli, A. A., Chi, Y., Swanger, J., Carter, J. H., Liao, Y., Welcker, M., ... Clurman, B. E. (2013). Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) by cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 regulates its inhibition by eEF2 kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 33(3), 596–604. <https://doi.org/10.1128/MCB.01270-12>
- Hochachka, P. W., & Lutz, P. L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 130(4), 435–459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691622>
- Hoeger, H., Engelmann, M., Bernert, G., Seidl, R., Bubna-Littitz, H., Mosgoeller, W., ... Lubec, G. (2000). Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences*, 66(10), 947–962. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714895>
- Hoeger, H., Engidawork, E., Stolzlechner, D., Bubna-Littitz, H., & Lubec, B. (2006). Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. *Amino Acids*, 31(4), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0393-z>
- Hope, P. L., Cady, E. B., Tofts, P. S., Hamilton, P. A., Costello, A. M. D., Delpy, D. T., ... Wilkie, D. R. (1984). CEREBRAL ENERGY METABOLISM STUDIED WITH PHOSPHORUS NMR SPECTROSCOPY IN NORMAL AND BIRTH-ASPHYXIATED INFANTS. *The Lancet*, 324(8399), 366–370. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)90539-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)90539-7)
- Hou, S. T., Jiang, S. X., Aylsworth, A., Ferguson, G., Slinn, J., Hu, H., ... Kaibuchi, K. (2009). CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 111(3), 870–881. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06375.x>
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003>
- Hu, P., Wang, M., Chen, W.-H., Liu, J., Chen, L., Yin, S.-T., ... Ruan, D.-Y. (2008). Quercetin relieves chronic lead exposure-induced impairment of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 378(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0301-z>
- Hu, X., Rea, H. C., Wiktorowicz, J. E., & Perez-Polo, J. R. (2006). Proteomic Analysis of Hypoxia/Ischemia-Induced Alteration of Cortical Development and Dopamine Neurotransmission in Neonatal Rat. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2396–2404. <https://doi.org/10.1021/pr060209x>
- Huang, Y., Lai, H., Xu, H., Wu, W., Lai, X., Ho, G., ... Chen, Y. (2013). Impact of perinatal systemic hypoxic-ischemic injury on the brain of male offspring rats: An improved model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in early preterm newborns. *PLoS ONE*, 8(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082502>
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., ... Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(8), 781–782. <https://doi.org/10.1038/90476>
- Iuvone, L., Geloso, M. C., & Dell'Anna, E. (1996). Changes in Open Field Behavior, Spatial Memory, and Hippocampal Parvalbumin Immunoreactivity Following Enrichment in Rats Exposed to Neonatal Anoxia. *Experimental Neurology*, 139(1), 25–33. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0077>
- Iwata, O., Iwata, S., Bainbridge, A., De Vita, E., Matsuishi, T., Cady, E. B., & Robertson, N. J. (2008). Supra- and sub-baseline phosphocreatine recovery in developing brain after transient hypoxia-ischaemia: relation to baseline energetics, insult severity and outcome. *Brain*, 131(8), 2220–2226. <https://doi.org/10.1093/brain/awn150>
- Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., & Davis, P. G. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003311.pub3>
- James, A., & Cherian, S. (2010). Pathophysiology of perinatal hypoxia-ischaemia. *Paediatrics and Child Health*, 20(8), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2010.03.002>
- Ji, L.-L., Sheng, Y.-C., Zheng, Z.-Y., Shi, L., & Wang, Z.-T. (2015). The involvement of p62-Keap1-Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.035>
- Johansen, F. F., Sørensen, T., Tønder, N., Zimmer, J., & Diemer, N. H. (1992). Ultrastructure of neurons containing somatostatin in the dentate hilus of the rat hippocampus after cerebral ischaemia, and a note on their commissural connections. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 18(2), 145–157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352389>
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., ... Bickford, P. C. (1998). Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(19), 8047–8055. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742171>

- Kahle, K., Kraus, M., & Richling, E. (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(8), 797–806. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500064>
- Kale, A., Pişkin, Ö., Başı, Y., Aydın, B. G., Can, M., Elmas, Ö., & Büyükuysal, Ç. (2018). Neuroprotective effects of Quercetin on radiation-induced brain injury in rats. *Journal of Radiation Research*, 59(4), 404–410. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry032>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kartje-Tillotson, G., Neafsey, E. J., & Castro, A. J. (1985). Electrophysiological analysis of motor cortical plasticity after cortical lesions in newborn rats. *Brain Research*, 332(1), 103–111. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90393-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90393-2)
- Kaufman, S. A., Miller, S. P., Ferriero, D. M., Glidden, D. H., Barkovich, A. J., & Partridge, J. C. (2003). Encephalopathy as a predictor of magnetic resonance imaging abnormalities in asphyxiated newborns. *Pediatric Neurology*, 28(5), 342–346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878294>
- Kaushik, D., O'Fallon, K., Clarkson, P. M., Patrick Dunne, C., Conca, K. R., & Michniak-Kohn, B. (2012). Comparison of Quercetin Pharmacokinetics Following Oral Supplementation in Humans. *Journal of Food Science*, 77(11), H231–H238. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02934.x>
- Kawabata, K., Mukai, R., & Ishisaka, A. (2015). Quercetin and related polyphenols: New insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food and Function*, 6(5), 1399–1417. <https://doi.org/10.1039/c4fo01178c>
- Keddy, P. G. W., Dunlop, K., Warford, J., Samson, M. L., Jones, Q. R. D., Rupasinghe, H. P. V., & Robertson, G. S. (2012). Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of the Flavonoid-Enriched Fraction AF4 in a Mouse Model of Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *PLoS ONE*, 7(12), e51324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051324>
- Kim, H.-J., Kim, S.-K., Kim, B.-S., Lee, S.-H., Park, Y.-S., Park, B.-K., ... Jung, J.-Y. (2010). Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8643–8650. <https://doi.org/10.1021/jf101510z>
- Kirchengast Beda, S. H. (2009). The Male Disadvantage Hypothesis Reconsidered: Is There Really a Weaker Sex? An Analysis of Gender Differences in Newborn Somatometrics and Vital Parameters. *Journal of Life Sciences*, 1(1), 63–71. <https://doi.org/10.1080/09751270.2009.11885136>
- Kiss, P., Szogyi, D., Reglodi, D., Horvath, G., Farkas, J., Lubics, A., ... Koppan, M. (2009). Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats. *Brain Research*, 1255, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.018>
- Kiss, P., Tamas, A., Lubics, A., Szalai, M., Szalontay, L., Lengvari, I., & Reglodi, D. (2005). Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotoxicity Research*, 8(3–4), 235–244. <https://doi.org/10.1007/BF03033977>
- Kiss, P., Vadasz, G., Kiss-Illes, B., Horvath, G., Tamas, A., Reglodi, D., & Koppan, M. (2013). Environmental enrichment decreases asphyxia-induced neurobehavioral developmental delay in neonatal rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 22258–22273. <https://doi.org/10.3390/ijms141122258>
- Klee, C. B., Crouch, T. H., & Krinks, M. H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(12), 6270–6273. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.12.6270>
- Ko, C. C., Chen, Y. J., Chen, C. T., Liu, Y. C., Cheng, F. C., Hsu, K. C., & Chow, L. P. (2014). Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22078–22089. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.553248>
- Kobeissy, F. H., Ottens, A. K., Zhang, Z., Liu, M. C., Denslow, N. D., Dave, J. R., ... Wang, K. K. W. (2006). Novel differential neuroproteomics analysis of traumatic brain injury in rats. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 5(10), 1887–1898. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600157-MCP200>
- Kohlhauser, C., Kaehler, S., Mosgoeller, W., Singewald, N., Kouvelas, D., Prast, H., ... Lubec, B. (1999). Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences*, 64(23), 2109–2124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10372653>
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, 86(6), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>
- Laplante, F., Brake, W. G., Chehab, S. L., & Sullivan, R. M. (2012). Sex differences in the effects of perinatal anoxia on dopamine function in rats. *Neuroscience Letters*, 506(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2011.10.055>
- Launey, T., Endo, S., Sakai, R., Harano, J., & Ito, M. (2004). Protein phosphatase 2A inhibition induces cerebellar long-

- term depression and declustering of synaptic AMPA receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 676–681. <https://doi.org/10.1073/pnas.0302914101>
- Lee, E.-J., Ji, G.-E., & Sung, M.-K. (2010). Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 59(10), 847–854. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0196-2>
- Lee, K. W., Kang, N. J., Heo, Y.-S., Rogozin, E. A., Pugliese, A., Hwang, M. K., ... Dong, Z. (2008). Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Research*, 68(3), 946–955. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3140>
- Lei, H., Luo, J., Tong, L., Peng, L. Q., Qi, Y., Jia, Z. G., & Wei, Q. (2011). Quercetin binds to calcineurin at a similar region to cyclosporin A and tacrolimus. *Food Chemistry*, 127(3), 1169–1174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.119>
- Leonardo, C. C., Agrawal, M., Singh, N., Moore, J. R., Biswal, S., & Doré, S. (2013). Oral administration of the flavanol (–)-epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3659–3668. <https://doi.org/10.1111/ejn.12362>
- Li, C., ZHANG, X., Xinliang, X., Xiaoying, X., Guojian, G., & Chen, Z. (2013). Preparation and characterization of flexible nanoliposomes loaded with daptomycin, a novel antibiotic, for topical skin therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 1285. <https://doi.org/10.2147/IJN.S41695>
- Li, H.-Y., Hu, J., Zhao, S., Yuan, Z.-Y., Wan, H.-J., Lei, F., ... Du, L.-J. (2012). Comparative Study of the Effect of Baicalin and Its Natural Analogs on Neurons with Oxygen and Glucose Deprivation Involving Innate Immune Reaction of TLR2/TNF α . *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/267890>
- Lin, C., Yu, Y., Zhao, H.-G., Yang, A., Yan, H., & Cui, Y. (2012). Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity in vitro and in vivo. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 104(3), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.10.023>
- Lin, J. W., Ju, W., Foster, K., Lee, S. H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., ... Sheng, M. (2000). Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1282–1290. <https://doi.org/10.1038/81814>
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J. E., ... Black, R. E. (2015). Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, 385, 430–440. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61698-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61698-6)
- Liu, P., Zou, D., Yi, L., Chen, M., Gao, Y., Zhou, R., ... Mi, M. (2015). Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the PGC-1 α pathway. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 33(2), 143–157. <https://doi.org/10.3233/RNN-140446>
- Liu, R.-L., Xiong, Q.-J., Shu, Q., Wu, W.-N., Cheng, J., Fu, H., ... Hu, Z.-L. (2012). Hyperoside protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via nitric oxide signal pathway. *Brain Research*, 1469, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.044>
- Liu, Y. V., Hubbi, M. E., Pan, F., McDonald, K. R., Mansharamani, M., Cole, R. N., ... Semenza, G. L. (2007). Calcineurin Promotes Hypoxia-inducible Factor 1 α Expression by Dephosphorylating RACK1 and Blocking RACK1 Dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 37064–37073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705015200>
- Loidl, C. F., Gavilanes, A. W. D., Van Dijk, E. H. J., Vreuls, W., Blokland, A., Vles, J. S. H., ... Blanco, C. E. (2000). Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiology and Behavior*, 68(3), 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00125-0)
- Loidl, C. F., Herrera-Marschitz, M., Andersson, K., You, Z.-B., Goiny, M., O'Connor, W. T., ... Ungerstedt, U. (1994). Long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia neurotransmitter systems studied with microdialysis in rat. *Neuroscience Letters*, 175(1–2), 9–12. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)91065-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)91065-0)
- Loidl, C. F., Herrera-Marschitz, M., Andersson, K., You, Z. B., Goiny, M., O'Connor, W. T., ... Chen, Y. (1994). Long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia neurotransmitter systems studied with microdialysis in rat. *Neuroscience Letters*, 175(1–2), 9–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7970219>
- Lou, H. C., Lassen, N. A., & Friis-Hansen, B. (1979). Impaired autoregulation of cerebral blood flow in the distressed newborn infant. *The Journal of Pediatrics*, 94(1), 118–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80373-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80373-X)
- Lu, Y., Chen, W., Lin, C., Wang, J., Zhu, M., Chen, J., & Miao, C. (2017). The protective effects of propofol against CoCl₂-induced HT22 cell hypoxia injury via PP2A/CAMKII α /nNOS pathway. *BMC Anesthesiology*, 17(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12871-017-0327-1>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, 157(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., ... Semenza, G. L. (2011). Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell*, 145(5), 732–744.

- <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.054>
- Lv, C., Hong, T., Yang, Z., Zhang, Y., Wang, L., Dong, M., ... Meng, Y. (2012). Effect of Quercetin in the 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/928643>
- Mallard, C., & Vexler, Z. S. (2015). Modeling ischemia in the immature brain: How translational are animal models? *Stroke*, 46(10), 3006–3011. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.007776>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710>
- Marcinkiewicz, C., Gałasiński, W., & Gindzieński, A. (1995). EF-1 alpha is a target site for an inhibitory effect of quercetin in the peptide elongation process. *Acta Biochimica Polonica*, 42(3), 347–350. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588487>
- Martinez-Biarge, M., Diez-Sebastian, J., Rutherford, M. A., & Cowan, F. M. (2010). Outcomes after central grey matter injury in term perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, 86(11), 675–682. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.08.013>
- Martínez, C., Pouso, C., Borbonet, D., Bidegain, M., & Goldberg, R. (n.d.). Neuroprotección mediante hipotermia moderada en recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica. *Archivos de Pediatría Del Uruguay*, 82(3), 159–170. Retrieved from http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-05842011000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- McGuire, W., 2007. Perinatal asphyxia. *Clin. Evid.* (Online) 2007
- Meyers, K. J., Rudolf, J. L., & Mitchell, A. E. (2008). Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 830–836. <https://doi.org/10.1021/jf072358l>
- Morales, P., Fiedler, J. L., Andrés, S., Berrios, C., Huaiquín, P., Bustamante, D., ... Herrera-Marschitz, M. (2008). Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, 86(12), 2650–2662. <https://doi.org/10.1002/jnr.21715>
- Morales, P., Reyes, P., Klawitter, V., Huaiquín, P., Bustamante, D., Fiedler, J., & Herrera-Marschitz, M. (2005). Effects of perinatal asphyxia on cell proliferation and neuronal phenotype evaluated with organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, 135(2), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.062>
- Morales, P., Simola, N., Bustamante, D., Lisboa, F., Fiedler, J., Gebicke-Haerter, P. J., ... Herrera-Marschitz, M. (2010). Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. *Experimental Brain Research*, 202(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-2103-z>
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., & Remesy, C. (2000). Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *BioFactors (Oxford, England)*, 12(1–4), 169–174. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216481>
- Morgan, J. J., Tulbert, C. D., & Ronca, A. E. (2012). Moderate Intrauterine Asphyxia Impairs Surface Righting in Neonatal Rats, 26(1), 45–49.
- Mozafari, M. R., Pardakhty, A., Azarmi, S., Jazayeri, J. A., Nokhodchi, A., & Omri, A. (2009). Role of nanocarrier systems in cancer nanotherapy. *Journal of Liposome Research*, 19(4), 310–321. <https://doi.org/10.3109/08982100902913204>
- Mulkey, R. M., Herron, C. E., & Malenka, R. C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5124), 1051–1055. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394601>
- Naeye, R. L., Burt, L. S., Wright, D. L., Blanc, W. A., & Tatter, D. (1971). Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics*, 48(6), 902–906. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5129451>
- Nakamura, K., Koderá, H., Akita, T., Shiina, M., Kato, M., Hoshino, H., ... Saito, H. (2013). De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Gαo Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 93(3), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.014>
- Nam, J. S., Sharma, A. R., Nguyen, L. T., Chakraborty, C., Sharma, G., & Lee, S. S. (2016). Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. *Molecules*, 21(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules21010108>
- Naragoni, S., Sankella, S., Harris, K., & Gray, W. G. (2009). Phytoestrogens regulate mRNA and protein levels of guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit (GNB1) in MCF-7 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 219(3), 584–594. <https://doi.org/10.1002/jcp.21699>
- Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., ... Kobori, M. (2015). Estimated Daily Intake and Seasonal Food Sources of Quercetin in Japan. *Nutrients*, 7(4), 2345–2358. <https://doi.org/10.3390/nu7042345>

- Odd, D. E., Lewis, G., Whitelaw, A., & Gunnell, D. (2009). Resuscitation at birth and cognition at 8 years of age: a cohort study. *Lancet (London, England)*, *373*(9675), 1615–1622. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60244-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60244-0)
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(1), 60–71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Ossola, B., Kääriäinen, T. M., & Männistö, P. T. (2009). The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opinion on Drug Safety*, *8*(4), 397–409. <https://doi.org/10.1517/14740330903026944>
- Pierson, C. R., Folkerth, R. D., Billiards, S. S., Trachtenberg, F. L., Drinkwater, M. E., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2007). Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. *Acta Neuropathologica*, *114*(6), 619–631. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0295-5>
- Ping HAN, S., Hang TANG, Y., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem. J*, *430*, 379–392. <https://doi.org/10.1042/BJ20100396>
- Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W., & Muchimapura, S. (2008). Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *4*(1), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.12.001>
- Pryds, O. (1991). Control of cerebral circulation in the high-risk Neonate. *Annals of Neurology*, *30*(3), 321–329. <https://doi.org/10.1002/ana.410300302>
- Pryor, W. A. (1991). The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(1), 391S–393S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.1.391S>
- Ptashne, K. A. M., Allan, E. M., & Robil, D. (n.d.). Allan Hence and Eu,gcnc.
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., ... Fujiwara, M. (2007). Neuroprotective Effects of Quercetin and Rutin on Spatial Memory Impairment in an 8-Arm Radial Maze Task and Neuronal Death Induced by Repeated Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci*, *104*, 329–334. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0070247>
- Qu, X., Qi, D., Dong, F., Wang, B., Guo, R., Luo, M., & Yao, R. (2014). Quercetin improves hypoxia-ischemia induced cognitive deficits via promoting remyelination in neonatal rat. *Brain Research*, *1553*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.035>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *50*(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quinn, C. C., Gray, G. E., & Hockfield, S. (1999). A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *Journal of Neurobiology*, *41*(1), 158–164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504203>
- Rainaldi, M. A., & Perlman, J. M. (2016). Pathophysiology of Birth Asphyxia. *Clinics in Perinatology*, *43*(3), 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.002>
- Raineki, C., De Souza, M. A., Szawka, R. E., Lutz, M. L., De Vasconcellos, L. F. T., Sanvitto, G. L., ... Lucion, A. B. (2009). Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience*, *159*(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.012>
- Ramachandra, R., & Subramanian, T. (2011). *Atlas of the neonatal rat brain*. CRC Press.
- Rapoport, J. L., Addington, A. M., Frangou, S., & Psych, M. R. C. (2005). The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry*, *10*(5), 434–449. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001642>
- Reinoso, B. S., & Castro, A. J. (1989). A study of corticospinal remodelling using retrograde fluorescent tracers in rats. *Experimental Brain Research*, *74*(2), 387–394. <https://doi.org/10.1007/BF00248872>
- Rivera, F., Costa, G., Abin, A., Urbanavicius, J., Arruti, C., Casanova, G., & Dajas, F. (2008). Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotoxicity Research*, *13*(2), 105–114. <https://doi.org/10.1007/BF03033562>
- Rivera, F., Urbanavicius, J., Gervaz, E., Morquio, A., & Dajas, F. (2004a). Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship. *Neurotoxicity Research*, *6*(7–8), 543–553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639786>
- Rivera, F., Urbanavicius, J., Gervaz, E., Morquio, A., & Dajas, F. (2004b). Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: Bioavailability and structure-activity relationship. *Neurotoxicity Research*, *6*(7–8), 543–553. <https://doi.org/10.1007/BF03033450>
- Robertson, N. J., Nakakeeto, M., Hagmann, C., Cowan, F. M., Acolet, D., Iwata, O., ... Jacobs, I. (2008). Therapeutic hypothermia for birth asphyxia in low-resource settings: a pilot randomised controlled trial. *The Lancet*, *372*(9641), 801–803. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61329-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61329-X)

- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.10.5858>
- Rogério, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., & Faccioli, L. H. (2007). Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, 56(10), 402–408. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7005-6>
- Rundén, E., Seglen, P. O., Haug, F. M., Ottersen, O. P., Wieloch, T., Shamloo, M., & Laake, J. H. (1998). Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(18), 7296–7305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736650>
- RUSSELL, P. A. (1973). RELATIONSHIPS BETWEEN EXPLORATORY BEHAVIOUR AND FEAR: A REVIEW. *British Journal of Psychology*, 64(3), 417–433. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1973.tb01369.x>
- Ryou, M.-G., Liu, R., Ren, M., Sun, J., Mallet, R. T., & Yang, S.-H. (2012). Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway. *Stroke*, 43(4), 1101–1107. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620088>
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Muñoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodríguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.027>
- Sachdeva, S., Pant, S. C., Kushwaha, P., Bhargava, R., & Flora, S. J. S. (2015). Sodium tungstate induced neurological alterations in rat brain regions and their response to antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.05.003>
- Sasaki, N., Toda, T., Kaneko, T., Baba, N., & Matsuo, M. (2003). Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 145(1), 101–116. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00248-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00248-X)
- Sato, Y., Ishida-Nakajima, W., Kawamura, M., Miura, S., Oguma, R., Arai, H., & Takahashi, T. (2011). Hypoxia–ischemia induces hypo-phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. *Brain Research*, 1386, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.027>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7.
- Schültke, E., Kamencic, H., Skihar, V. M., Griebel, R., & Juurlink, B. (2010). Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord*, 48(2), 112–117. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.111>
- Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273–278. <https://doi.org/10.1017/S002966511000162X>
- Shah, F.-A., Park, D.-J., & Koh, P.-O. (2018). Identification of Proteins Differentially Expressed by Quercetin Treatment in a Middle Cerebral Artery Occlusion Model: A Proteomics Approach. *Neurochemical Research*, 43(8), 1608–1623. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2576-x>
- Shah, Z. A., Li, R.-C., Ahmad, A. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Biswal, S., & Doré, S. (2010). The Flavanol (–)-Epicatechin Prevents Stroke Damage through the Nrf2/HO1 Pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(12), 1951–1961. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.53>
- Shankaran, S. (2009). Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. *Journal of Neurotrauma*, 26(3), 437–443. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0678>
- Shimizu, T., Uehara, T., & Nomura, Y. (2004). Possible involvement of pyruvate kinase in acquisition of tolerance to hypoxic stress in glial cells. *Journal of Neurochemistry*, 91(1), 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02702.x>
- Shoji, Y., & Nakashima, H. (2004). Nutraceuticals and delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 12(6), 385–391. <https://doi.org/10.1080/10611860400003817>
- Shutenko, Z., Henry, Y., Pinard, E., Seylaz, J., Potier, P., Berthet, F., ... Sercombe, R. (1999). Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochemical Pharmacology*, 57(2), 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00296-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00296-2)
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill Book Co.
- Silva, J. P., Gomes, A. C., & Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601(1–3), 50–60. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2008.10.046>
- Simola, N., Bustamante, D., Pinna, A., Pontis, S., Morales, P., Morelli, M., & Herrera-Marschitz, M. (2008). Acute

- perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Experimental Brain Research*, 185(4), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s00221-007-1186-7>
- Sonna, L. A., Cullivan, M. L., Sheldon, H. K., Pratt, R. E., & Lilly, C. M. (2003). Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). *Physiological Genomics*, 12(3), 195–207. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00104.2002>
- Spencer, J. P. E. (2009). Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes & Nutrition*, 4(4), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0136-3>
- Strackx, E., Van den Hove, D. L. A., Prickaerts, J., Zimmermann, L., Steinbusch, H. W. M., Blanco, C. E., ... Vles, J. S. H. (2010). Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.040>
- Su, K.-Y., Chien, W.-L., Fu, W.-M., Yu, I.-S., Huang, H.-P., Huang, P.-H., ... Lin, S.-W. (2007). Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 2513–2524. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4497-06.2007>
- Sullivan, R. M., & Brake, W. G. (2003). What the rodent prefrontal cortex can teach us about attention-deficit/hyperactivity disorder: the critical role of early developmental events on prefrontal function. *Behavioural Brain Research*, 146(1–2), 43–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643458>
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., ... von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Takei, N., Kondo, J., Nagaike, K., Ohsawa, K., Kato, K., & Kohsaka, S. (1991). Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *Journal of Neurochemistry*, 57(4), 1178–1184. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1895102>
- Takizawa, S., Fukuyama, N., Hirabayashi, H., Kohara, S., Kazahari, S., Shinohara, Y., & Nakazawa, H. (2003). Quercetin, a natural flavonoid, attenuates vacuolar formation in the optic tract in rat chronic cerebral hypoperfusion model. *Brain Research*, 980(1), 156–160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865172>
- The Gene Ontology Consortium. (2017). Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D331–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1108>
- The Open Field Test. (2004). Retrieved from <http://www.uonbi.ac.ke/projects/ibro/images/documents/workshops2005/open-field-method-2005.pdf>
- Tilney, F. (1933). Behavior in its relation to the development of the brain, II. *Bull. Neural. Inst.*, N. Y., 3,252-358
- Towfighi, J., Housman, C., Vannucci, R. C., & Heitjan, D. F. (1994). Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain damage on the gross development of opposite cerebral hemisphere. *Biology of the Neonate*, 65(2), 108–118. <https://doi.org/10.1159/000244036>
- Trujillo Gómez, C. C., Montoya Restrepo, M., & Bruera, E. (2005). Vías alternativas a la vía oral para administración sistémica de opioides en Cuidados Paliativos. Revisión de la literatura. *Medicina Paliativa*, 12(2), 108–122.
- TSUCHIMOTO, T., SAKATA, K., SOMEYA, M., YAMAMOTO, H., HIRAYAMA, R., MATSUMOTO, Y., ... HAREYAMA, M. (2011). Gene Expression Associated with DNA-Dependent Protein Kinase Activity under Normoxia, Hypoxia, and Reoxygenation. *Journal of Radiation Research*, 52(4), 464–471. <https://doi.org/10.1269/jrr.10137>
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., ... Goshima, Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3 β phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to Cells*, 10(2), 165–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x>
- Ungethüm, U., Chen, Y., Gross, J., Bjelke, B., Bolme, P., Eneroth, P., ... Andersson, K. (1996). Effects of perinatal asphyxia on the mesostriatal/mesolimbic dopamine system of neonatal and 4-week-old male rats. *Experimental Brain Research*, 112(3), 403–410. <https://doi.org/10.1007/BF00227946>
- van Bel, F. V., & Groenendaal, F. (2016). Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia. *Seminars in Perinatology*, 40(3), 152–159. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.12.003>
- Van de Berg, W. D. J., Kwajitaa, M., de Louw, A. J. A., Lissone, N. P. A., Schmitz, C., Faull, R. L. M., ... Steinbusch, H. W. M. (2003). Impact of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience*, 117(1), 83–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605895>
- Van Elzen, R., Moens, L., & Dewilde, S. (2008). Expression profiling of the cerebral ischemic and hypoxic response. *Expert Review of Proteomics*, 5(2), 263–282. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.263>
- van Erp, T. G. M., Salehi, P. A., Rosso, I. M., Huttunen, M., Lönnqvist, J., Pirkola, T., ... Cannon, T. D. (2002). Contributions of Genetic Risk and Fetal Hypoxia to Hippocampal Volume in Patients With Schizophrenia or Schizoaffective Disorder, Their Unaffected Siblings, and Healthy Unrelated Volunteers. *American Journal of*

- Psychiatry*, 159(9), 1514–1520. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.9.1514>
- van Handel, M., Swaab, H., de Vries, L. S., & Jongmans, M. J. (2007). Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *European Journal of Pediatrics*, 166(7), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0437-8>
- Van Hoof, C., & Goris, J. (2003). Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1640(2–3), 97–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12729918>
- Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage: Evolution of an Animal Model. *Developmental Neuroscience*, 27(2–4), 81–86. <https://doi.org/10.1159/000085978>
- Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 18), 3149–3154. <https://doi.org/10.1242/jeb.01064>
- Vargas, A. J., & Burd, R. (2010). Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutrition Reviews*, 68(7), 418–428. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x>
- Vázquez-Borsetti, P., Peña, E., Rico, C., Noto, M., Miller, N., Cohon, D., ... Loidl, F. C. (2016). Perinatal Asphyxia Reduces the Number of Reelin Neurons in the Prelimbic Cortex and Deteriorates Social Interaction in Rats. *Developmental Neuroscience*, 38(4), 241–250. <https://doi.org/10.1159/000448244>
- Venerosi, A., Cutuli, D., Chiarotti, F., & Calamandrei, G. (2006). C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats. *Behavioural Brain Research*, 168(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.10.010>
- Vengellur, A., Phillips, J. M., Hogenesch, J. B., & LaPres, J. J. (2005). Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells. *Physiological Genomics*, 22(3), 308–318. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00045.2004>
- Vengellur, A., Woods, B. G., Ryan, H. E., Johnson, R. S., & LaPres, J. J. (2003). Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts. *Gene Expression*, 11(3–4), 181–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14686790>
- Vesoulis, Z. A., Liao, S. M., Trivedi, S. B., Ters, N. El, & Mathur, A. M. (2016). A novel method for assessing cerebral autoregulation in preterm infants using transfer function analysis. *Pediatric Research*, 79(3), 453–459. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.238>
- Vinacur, J., Krupitzki, H., Cuman, G., Marconi, E., Guevel, C., & Alonso, M. M. (2000). Hipoxia-asfíxia: análisis epidemiológico. Argentina 1992-1995. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 19(3), 113–119. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=91219304>
- Volpe, J.J., 2005. Encefalopatía hipóxico isquémica. *Neurología del Recién Nacido*. 4 ed. Philadelphia: Saunders, 289-341
- Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Wagner, W., & Dastyk, J. (2008). HIF-1 Is Up-Regulated in Activated Mast Cells by a Process That Involves Calcineurin and NFAT. *The Journal of Immunology*, 181(3), 1665–1672. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1665>
- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582919>
- Wang, H., Zhou, C. L., Lei, H., & Wei, Q. (2010). Inhibition of calcineurin by quercetin in vitro and in Jurkat cells. *Journal of Biochemistry*, 147(2), 185–190. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp163>
- Wang, Y., Wang, X. L., Xie, G. L., Li, H. Y., & Wang, Y. L. (2017). Collapsin response mediator protein-2-induced retinal ischemic injury in a novel mice model of ocular ischemia syndrome. *Chinese Medical Journal*, 130(11), 1342–1351. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.206340>
- Wattanathorn, J., Phachonpai, W., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Tong-Un, T., & Preechagoon, D. (2010). Neuroprotective Effect of Quercetin Encapsulated Liposomes: A Novel Therapeutic Strategy against Alzheimer's Disease. *American Journal of Applied Sciences*, 7(4), 480–485. Retrieved from <http://thescpub.com/pdf/10.3844/ajassp.2010.480.485>
- Weitzdröfer, R., Höger, H., Burda, G., Pollak, A., & Lubec, G. (2008). Differences in hippocampal protein expression at 3 days, 3 weeks, and 3 months following induction of perinatal asphyxia in the rat. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1945–1952. <https://doi.org/10.1021/pr700835y>
- Weng, C.-J., Chen, M.-J., Yeh, C.-T., & Yen, G.-C. (2011). Hepatoprotection of quercetin against oxidative stress by induction of metallothionein expression through activating MAPK and PI3K pathways and enhancing Nrf2 DNA-binding activity. *New Biotechnology*, 28(6), 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.003>
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O'Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., ... Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 179(S 1-2), 1–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054482>

- Xiong, T., Tang, J., Zhao, J., Chen, H., Zhao, F., Li, J., ... Mu, D. (2012). Involvement of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axonal injury after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rat. *Neuroscience*, *216*, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.052>
- Yao, R.-Q., Qi, D.-S., Yu, H.-L., Liu, J., Yang, L.-H., & Wu, X.-X. (2012). Quercetin Attenuates Cell Apoptosis in Focal Cerebral Ischemia Rat Brain Via Activation of BDNF–TrkB–PI3K/Akt Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, *37*(12), 2777–2786. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0871-5>
- Yi, K. D., & Simpkins, J. W. (2008). Protein phosphatase 1, protein phosphatase 2A, and calcineurin play a role in estrogen-mediated neuroprotection. *Endocrinology*, *149*(10), 5235–5243. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0610>
- Yin, Y., Wang, Y., Chen, L., Han, S., Zhao, L., Luo, Y., & Li, J. (2013). Tat-Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) Increases the Survival of Neurons After NMDA Excitotoxicity by Reducing the Cleavage of CRMP2. *Neurochemical Research*, *38*(10), 2095–2104. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1118-9>
- Zeskind, P. S., McMurray, M. S., Garber, K. A., Neuspiel, J. M., Cox, E. T., Grewen, K. M., ... Johns, J. M. (2011). Development of translational methods in spectral analysis of human infant crying and rat pup ultrasonic vocalizations for early neurobehavioral assessment. *Frontiers in Psychiatry*, *2*, 56. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00056>
- Zhang, Y. Q., Shi, J., Rajakumar, G., Day, A. L., & Simpkins, J. W. (1998). Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Research*, *784*(1–2), 321–324. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518671>
- Zhang, Y., Yi, B., Ma, J., Zhang, L., Zhang, H., Yang, Y., & Dai, Y. (2015). Quercetin Promotes Neuronal and Behavioral Recovery by Suppressing Inflammatory Response and Apoptosis in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *Neurochemical Research*, *40*(1), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1457-1>
- Zhang, Z., Ottens, A. K., Sadasivan, S., Kobeissy, F. H., Fang, T., Hayes, R. L., & Wang, K. K. W. (2007). Calpain-Mediated Collapsin Response Mediator Protein-1, -2, And -4 Proteolysis after Neurotoxic And Traumatic Brain Injury. <https://Home.Liebertpub.Com/Neu>. <https://doi.org/10.1089/NEU.2006.0078>
- Zhao, X., Wang, Q., Yang, S., Chen, C., Li, X., Liu, J., ... Cai, D. (2016). Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, *781*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.063>
- Zhao, Y., Zhang, J., Shi, X., Li, J., Wang, R., Song, R., ... Luo, J. (2016). Quercetin targets the interaction of calcineurin with LxVP-type motifs in immunosuppression. *Biochimie*, *127*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.04.011>
- Zhou, Y., Bhatia, I., Cai, Z., He, Q. Y., Cheung, P. T., & Chiu, J. F. (2008). Proteomic analysis of neonatal mouse brain: Evidence for hypoxia- and ischemia-induced dephosphorylation of collapsin response mediator proteins. *Journal of Proteome Research*, *7*(6), 2507–2515. <https://doi.org/10.1021/pr800108k>
- Zhu, M., Ding, J., Jiang, H., Kong, L., Sun, Z., Chen, J., & Miao, C. (2015). Propofol ameliorates endothelial inflammation induced by hypoxia/reoxygenation in human umbilical vein endothelial cells: Role of phosphatase A2. *Vascular Pharmacology*, *73*, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.06.002>
- Zlotnik, A., Sinelnikov, I., Gruenbaum, B. F., Gruenbaum, S. E., Dubilet, M., Dubilet, E., ... Teichberg, V. I. (2012). Effect of Glutamate and Blood Glutamate Scavengers Oxaloacetate and Pyruvate on Neurological Outcome and Pathohistology of the Hippocampus after Traumatic Brain Injury in Rats. *Anesthesiology*, *116*(1), 73–83. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31823d7731>