

## DAÑOS OBSERVADOS EN LA SUSTANCIA GRIS DEL CEREBELO DE RATAS EN DESARROLLO EXPUESTAS A HIPEROXIA POSTNATAL

L.M. Rojas<sup>a\*</sup>, A.N. Liscano<sup>a</sup>, A. Boada-Sucre<sup>b</sup>, María Palmar<sup>c</sup>, M. Moreno<sup>a</sup>, A. Gómez<sup>a</sup>, J.L. Prin<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai” (IIBCA-UDO). Departamento de Biomedicina, Cumaná, Venezuela.

<sup>b</sup> Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (IDECYT-UNESR). Caracas, Venezuela.

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas. Fac. de Medicina. Universidad del Zulia. Venezuela.

<sup>d</sup> Departamento de materiales, IIBCA-UDO.

\* Autor de correspondencia, e-mail: [lmarinarojas@yahoo.com](mailto:lmarinarojas@yahoo.com)

Recibido: Octubre 2012. Aprobado: Febrero 2013.

Publicado: Abril 2013.

### RESUMEN

La terapia con oxígeno puede resultar perjudicial para el encéfalo del neonato prematuro causando, más tarde, retardo en el aprendizaje, la memoria y alteración del sistema motor durante los primeros años de vida. El cerebelo nace muy inmaduro y se conoce poco acerca de las alteraciones estructurales y ultraestructurales que presenta cuando se es expuesto a altas concentraciones de oxígeno. Para estudiar estos daños, un grupo de ratas fue expuesto a hiperoxia ( $80 \pm 5\% O_2$ ) desde su nacimiento hasta los 3, 6, 9, 12 y 14 días de edad (P3, P6, P9, P12 y P14). Un grupo similar fue colocado en normoxia ( $21\% O_2$ ). Muestras de la corteza cerebelosa en cada uno de los períodos experimentados se procesaron con técnicas convencionales para la microscopía electrónica de transmisión. En las ratas expuestas a hiperoxia, se observó la mayor cantidad de células con pignocis. Se ha demostrado que los radicales libres promueven la proliferación de factores que activan la muerte celular por apoptosis. En P6 se observaron células de Purkinje (CPk) oscuras con un retículo endoplasmático rugoso (RER) distendido y un complejo de Golgi (G) alterado. En P9, las vacuolizaciones en varias células granulares adyacentes provocaron necrosis. La desestabilización de las membranas celulares pudo deberse a procesos de peroxidación lipídica. En todos los períodos se observaron capilares obstruidos con edema endotelial. Esto conduce a la isquemia e impide el normal transporte de oxígeno hacia los astrocitos perivasculares y demás células que componen la barrera hematoencefálica. La elevada toxicidad de la hiperoxia en el prematuro se debe, presumiblemente, a la inmadurez de su sistema antioxidante.

**Palabras Clave:** Cerebelo, hiperoxia, necrosis, edema endotelial

### DAMAGE OBSERVED IN THE GRAY MATTER OF THE CEREBELLAR CORTEX OF DEVELOPING RATS EXPOSED TO POSTNATAL HYPEROXIA

#### ABSTRACT

Oxygen therapy may be harmful to the brain in premature neonate causing later, delay in learning, memory and motor system disorder. The cerebellum is born very immature and little is known about the structural and ultrastructural alterations that presents, when it's exposed to high concentrations of oxygen. To study this damage, a group of rats was exposed to hyperoxia ( $80 \pm 5\% O_2$ ) from birth to 3, 6, 9, 12 and 14 days of age (P3, P6, P9, P12 and P14). A similar group was placed in normoxia ( $21\% O_2$ ). Samples of the cerebellar cortex in each of the periods experienced were processed with conventional techniques for transmission electron microscopy. In rats exposed to hyperoxia, P3 showed the highest number of pignotic cells. It has been shown that oxygen free radicals promote proliferation of factors that trigger cell death caused by apoptosis and necrosis. In P6 were observed dark Purkinje cells (Pkc) with distended rough endoplasmic reticulum (RER) and altered Golgi complex (G). In P9, the vacuolizations caused necrosis in adjacent granular cells. Destabilization of cell membranes might be due to lipid peroxidation processes. In all periods, were observed obstructed capillary produced for endothelial edema. This leads to ischemia and prevent normal oxygen transport to the perivascular astrocytes and other cells that form the blood brain barrier. The high toxicity of hyperoxia in the premature cerebellum is apparently due to the immaturity of their antioxidant system.

**Keywords:** Cerebellum, hyperoxia, necrosis, endothelial edema.

## INTRODUCCIÓN

En condiciones normales el encéfalo humano y el de muchos mamíferos nace inmaduro, estado que lo hace muy susceptible a cualquier cambio interno o ambiental que pueda alterar la homeostasis celular durante el desarrollo. Bajo condiciones controladas se ha demostrado que el oxígeno es el parámetro ambiental más nocivo para el encéfalo del prematuro [1].

En el cerebro inmaduro expuesto a la hiperoxia postnatal muere un gran número de neuronas debido a que el sistema antioxidante del prematuro no está lo suficientemente desarrollado como para evitar el daño celular producido por el estrés oxidativo [1, 2, 3]. La retina también sufre severos daños tanto funcionales [4, 5] como estructurales y ultraestructurales [6, 7] cuando el individuo prematuro es expuesto a la hiperoxia postnatal. Muy recientemente, fue reportado que los astrocitos en cultivo expuestos a hiperoxia mostraron una disminución de la capacidad para proteger a las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) contra los efectos tóxicos del glutamato exógeno. La hiperoxia conduce a una alteración en la homeostasis del glutamato dañando así la materia blanca del cerebro [8].

El cerebelo es una región del encéfalo que resulta esencial para coordinar los movimientos del cuerpo. Es un centro reflejo que actúa en la coordinación y el mantenimiento de la postura y del equilibrio [9]. El cerebelo es más frágil que el cerebro a cualquier factor adverso para su desarrollo ya que al nacer presenta solamente un 3% del número total de células, mientras que el cerebro presenta un 50% [10]. No obstante, la muerte neuronal durante el desarrollo cerebelar puede retardar el aprendizaje motor y cognitivo en los primeros años de vida [11].

Son numerosas las investigaciones cuyos resultados muestran las alteraciones funcionales, estructurales, bioquímicas y neurofisiológicas, que se producen en el cerebro y la retina de niños y animales de experimentación prematuros expuestos a la hiperoxia

postnatal. Sin embargo, no existen muchos estudios que comuniquen el efecto de la hiperoxia sobre el cerebelo prematuro.

El objetivo del presente estudio es analizar los daños estructurales y ultraestructurales observados en la sustancia gris de la corteza cerebelosa de ratas en desarrollo expuestas a la hiperoxia postnatal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley procedentes del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

### Inducción a la hiperoxia

En una incubadora dividida en dos se colocaron, de un lado 12 ratas recién nacidas, con su madre. Desde el día de su nacimiento, las ratas fueron expuestas diariamente a  $80 \pm 1\%$  de  $O_2$  con tres interrupciones de 21% de  $O_2$ . Cada interrupción tuvo una duración de 30 min [4, 6, 7]. El nivel de oxígeno en la incubadora fue mantenido a  $80 \pm 1\%$  utilizando un analizador de oxígeno (7820 Oxygen Monitoring System), el cual fue conectado a la incubadora y calibrado diariamente.

El régimen de hiperoxia, se mantuvo desde el día del nacimiento de las ratas, hasta los 3, 6, 9 12 y 14 días de desarrollo postnatal (P3, P6, P9, P12 y P14). Luego de finalizado cada uno de los periodos de oxigenación, las ratas fueron sacrificadas inmediatamente para la realización de los análisis histológicos. Paralelamente, se estableció el grupo control, el cual se mantuvo en otra incubadora, a un ambiente normóxico (21%  $O_2$ ).

Con el fin de evitar las complicaciones pulmonares que con frecuencia son señaladas en las ratas adultas expuestas a la hiperoxia, la madre de las crías sometidas a hiperoxia se alternaron cada día con la madre de las crías controles, las cuales estuvieron en el ambiente normóxico [4, 6, 7]. A los dos grupos experimentales (control e hiperoxia) se les suministró alimento y agua *ad libitum*.

### Procesamiento histológico

Para los análisis histológicos del cerebelo se utilizaron 5 especímenes por grupo experimental. Seguidamente al sacrificio, el cerebelo fue enucleado y colocado rápidamente en glutaraldehído 4% en bufer cacodilato 0,1M, pH 7,4 y a una temperatura de 4°C.

Posteriormente se realizaron secciones sagitales del vermis. Estas secciones fueron fijadas en glutaraldehído y pasadas las 72 horas se cortaron para obtener muestras de aproximadamente 2 mm a nivel de la corteza cerebelosa, e inmediatamente se colocaron en glutaraldehído por 5 días. Las muestras de cerebelo fueron embebidas en Epón para el procesamiento histológico de acuerdo a técnicas previamente utilizadas [6, 7].

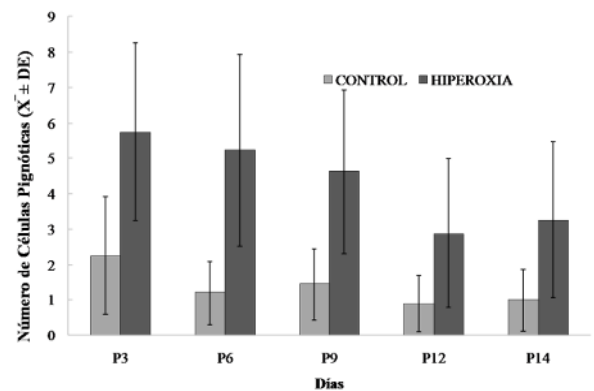
Seguidamente se efectuaron cortes finos (80 nm) con cuchilla de diamante en el ultramicrotomo Leica UM-UC6 y se intensificó el contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo previa observación al microscopio electrónico de transmisión (HITACHI H-600).

Sobre micrografías de cortes semifinos de la sustancia gris de la corteza cerebelosa se hicieron los contajes de células pignóticas, basados en su aspecto osmiofilico característico. Se utilizó un total de 4 individuos por tratamiento. Las comparaciones se hicieron con los promedios de los contajes de células pignóticas por período postnatal (P3, P6, P9, P12 y P14) y por tratamiento (Hiperoxia y Control), y se calculó la desviación estándar (DE).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

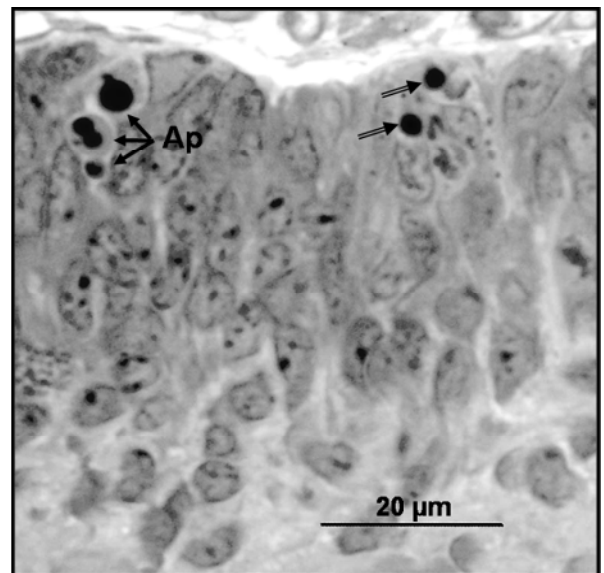
Se observaron alteraciones estructurales y ultraestructurales en la corteza cerebelosa de las ratas expuestas a hiperoxia.

En la sustancia gris de las ratas expuestas a hiperoxia se pudo observar pignosis en todos los períodos analizados. Las ratas expuestas a hiperoxia mostraron una tendencia superior de presentar células pignóticas comparadas con las controles (Fig. 1), siendo en P3 donde se observó el mayor número de pignosis (Fig. 1, 2 y 3).

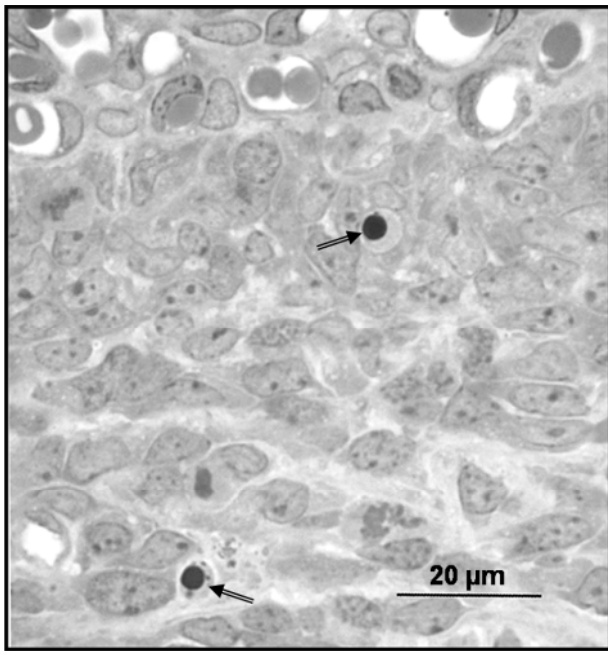


**Fig. 1.** Promedio de células pignóticas en la sustancia gris de ratas expuestas a hiperoxia postnatal. ( $\bar{X} \pm DE$ ) = promedio  $\pm$  desviación estandar.

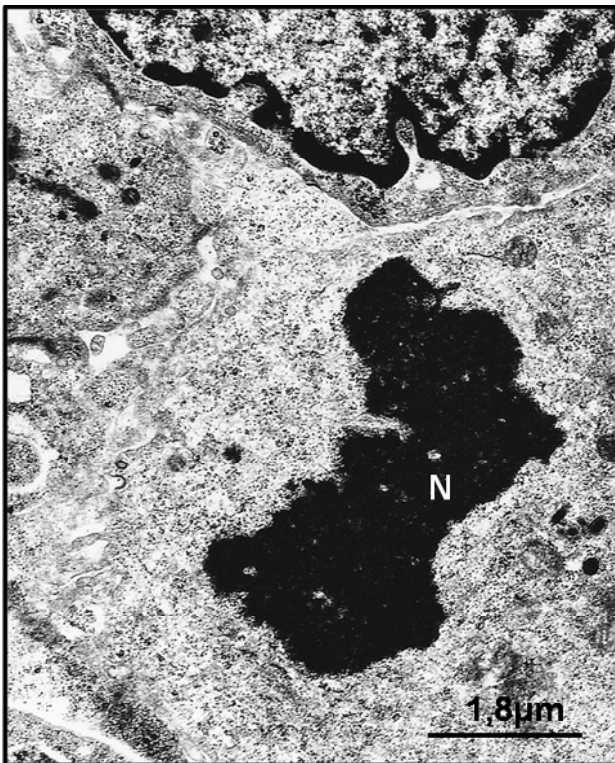
Se observaron células con núcleos fragmentados (Fig. 2) y en vías de la fragmentación (Fig. 4). Estas células pignóticas pueden, morir bien sea por la vía de la apoptosis o de la necrosis. En condiciones normales, la apoptosis, es un importante mecanismo que determina el tamaño, la forma y la función del sistema nervioso de los vertebrados [12].



**Fig. 2.** Micrografías ópticas de capa granular externa de ratas expuestas a hiperoxia durante 3 días. Se observan células con procesos apoptóticos (Ap) y otras con núcleos pignóticos (Flecha doble).



**Fig. 3.** Micrografías ópticas de capa granular externa de ratas expuestas a hiperoxia durante 3 días. Se observan células con núcleos pignóticos (Flecha doble).



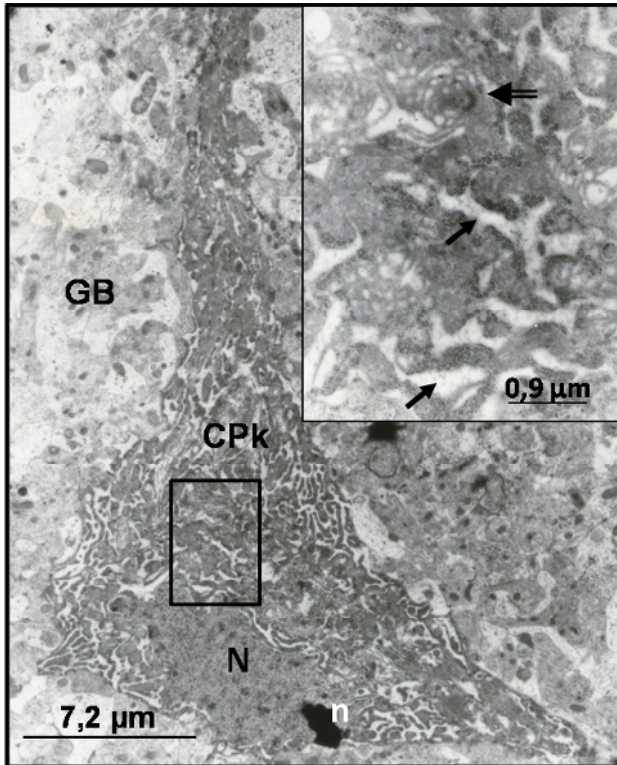
**Fig. 4.** Micrografía electrónica en la Capa granular interna de la corteza cerebelosa de rata expuesta a hiperoxia durante 14 días. Se observa neurona con núcleo denso próximo a fragmentarse, posiblemente para dar paso a una apoptosis.

La apoptosis se diferencia de la necrosis por sus características morfológicas. Es un evento controlado que requiere de energía, donde las células se vuelven más condensadas por la pérdida de agua. Durante todo el proceso la membrana celular y los organelos permanecen intactos. Como el contenido celular nunca se derrama hacia las zonas aledañas, entonces no se producen reacciones inflamatorias [13]. En contraste, la necrosis es un proceso desordenado, que no requiere energía donde el resultado final es la ruptura de la membrana celular y el derrame del contenido celular en el espacio intersticial. Esto trae como consecuencia una respuesta inflamatoria en el área que puede ir en detrimento de las células que la rodean [13]. Se ha demostrado, mediante ensayos TUNEL que procesos similares a la apoptosis pueden ser observados en células en estado de necrosis [14]. Es posible que estas dos rutas de muerte celular coexistan o que otros mecanismos de muerte celular por apoptosis o por necrosis puedan llegar a ser inducidos en la hiperoxia [15]. Inductores conocidos de apoptosis pueden provocar la muerte celular vía necrosis. Estas apoptosis y necrosis pueden ser inducidas por el mismo agente en la misma población celular y estos procesos pueden estar presentes simultáneamente en tejidos que experimentan el mismo daño [14].

Procesos apoptóticos y necróticos han sido observados al mismo tiempo y en la misma zona en la retina de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia durante los primeros 12 días de vida [7]. Por otro lado, mediante pruebas inmunohistoquímicas y ELISA, se encontró una disminución de la densidad neuronal del hipocampo, corteza prefrontal y corteza parietal la que fue atribuida a un aumento de la actividad apoptótica en estas regiones del cerebro ocasionada por la hiperoxia [3]. Se ha demostrado, que la caspasa-2 en combinación con la cascada intrínseca apoptótica induce daños en el SNC [16]. La alta producción de radicales que tienen lugar en la cadena transportadora de electrones de las células del SN debido a su elevada demanda energética, aunada a la

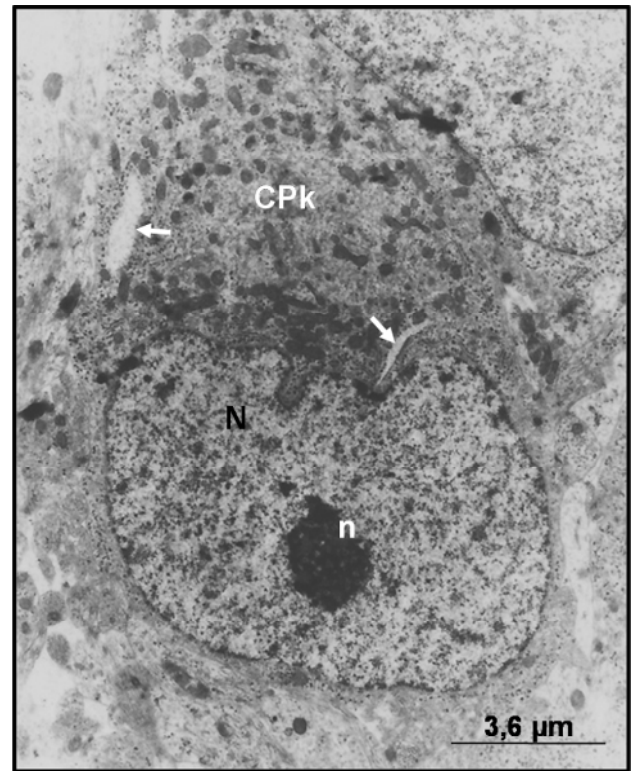


pobre actividad antioxidante enzimática del prematuro y a las elevadas concentraciones de compuestos fácilmente oxidables, convierten al estrés oxidativo en un fenómeno que contribuye con los mecanismos que conducen a la muerte celular y, por tanto, a la pérdida neuronal observada en diferentes enfermedades neurodegenerativas [17].



**Fig. 5.** Micrografía electrónica de célula de Purkinje (CPk) y Glia de Bergmann (GB) en proceso de necrosis. Se observa núcleo (N), nucléolo (n), RER con cisternas distendidas (Flecha) y Golgi alterado en forma de roseta (flecha doble).

En la capa de células de Purkinje (CCPk) de una rata expuesta a hiperoxia hasta P6 se observaron células oscuras y deformes. En la Figura 5 se observa una CPk que ha perdido su integridad estructural debido a un evidente proceso muerte celular por necrosis. En su citoplasma se encuentra la sustancia de Nissl completamente alterada, evidenciada por el distendimiento de las cisternas del RER, además de la pérdida de la integridad del complejo de Golgi llegando a formar una estructura en forma de roseta.



**Fig. 6.** Micrografía electrónica de Célula de Purkinje (CPk) con forma típica piriforme. Se observa núcleo (N), nucléolo (n), En el cono apical se observan dos cisternas del RER distendidas (Flecha).

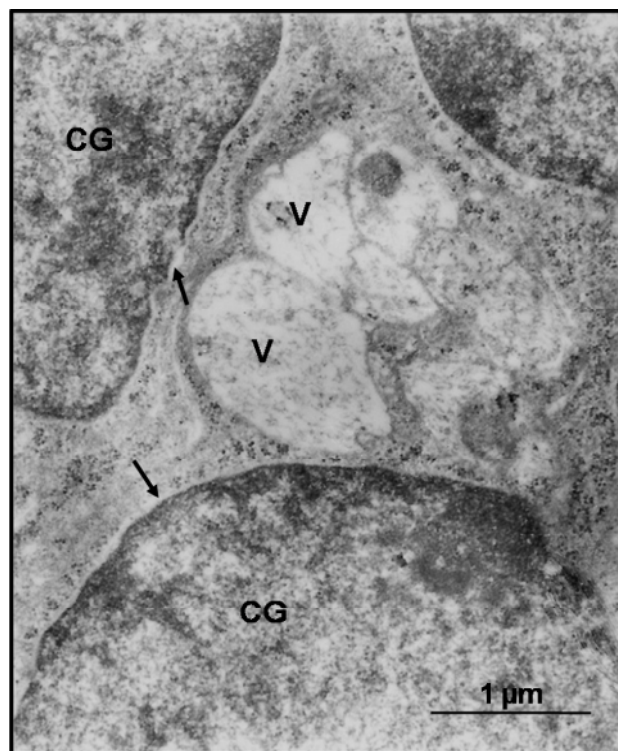
La Glia de Bergmann (GB) que rodea la CPk (Fig. 5) también se encuentra afectada por la necrosis. La muerte patológica observada en muchas CPk pudo deberse a la acción tóxica de la hiperoxia que causó daños irreparables en las neuronas activando sus procesos de necrosis. Estas alteraciones contrastan con las observadas en la CCPk del cerebelo de otro ejemplar del mismo tratamiento donde se evidencia una CPk con una estructura típica piriforme y escasas alteraciones en las cisternas del RER del cono apical (Fig. 6). El RER es el responsable de la biosíntesis, plegamiento, ensamblaje y modificación de proteínas solubles y de membrana y almacenamiento de calcio [18]. Estas funciones están directamente relacionadas con procesos esenciales de secreción, diferenciación celular, motilidad, proliferación celular, supervivencia y apoptosis [19]. En todos estos procesos está involucrada la señalización celular calcio-dependiente. El RER también tiene un papel importante en la detección de estrés celular [18]. Este organelo

media un conjunto específico de vías de señalización intracelular en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas en el lumen y estas vías se conocen colectivamente como respuesta a las proteínas mal plegadas. Las nuevas observaciones sugieren que la respuesta a proteínas mal plegadas pueden iniciar procesos de inflamación y el acoplamiento de estas respuestas en las células y tejidos especializados ahora se cree que es fundamental en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias [18].

El daño neuronal también está asociado con un incremento de aminoácidos excitatorios, glutamato y aspartato en el medio extracelular, los cuales podrían prolongar la activación de receptores de membrana y alterar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, frecuentemente involucrado en el mecanismo de muerte celular [20, 21]. Los efectos tóxicos de la hiperoxia son más obvios en las mitocondrias las cuales usualmente se observan hinchadas con pérdida de sus crestas [22]. Las mitocondrias aparecen hinchadas debido a la entrada de agua y sodio a la célula ya que el proceso activo de la bomba sodio y potasio se detiene [23]. Las mitocondrias son estructuras que suministran la energía celular involucrada con los procesos oxidativos celulares, por tanto son indicadores sumamente sensibles que expresan el estado de salud celular, de allí que sus modificaciones reflejan estados patológicos celulares. Períodos de hipoxia relativa pueden producir también una alteración en las mitocondrias frenando la fosforilación oxidativa y disminuyendo así la producción de ATP [12]. Cuando el descenso de ATP es acentuado se produce la salida de iones calcio de las mitocondrias al citosol, lo que activa las fosfolipasas y proteasas que actúan entonces sobre la membrana celular, el citoesqueleto y la membrana de los organelos, produciendo ruptura de membranas y filamentos [23].

En la capa granular interna (CGI) de la corteza cerebelosa de ratas expuestas a hiperoxia hasta P9, se

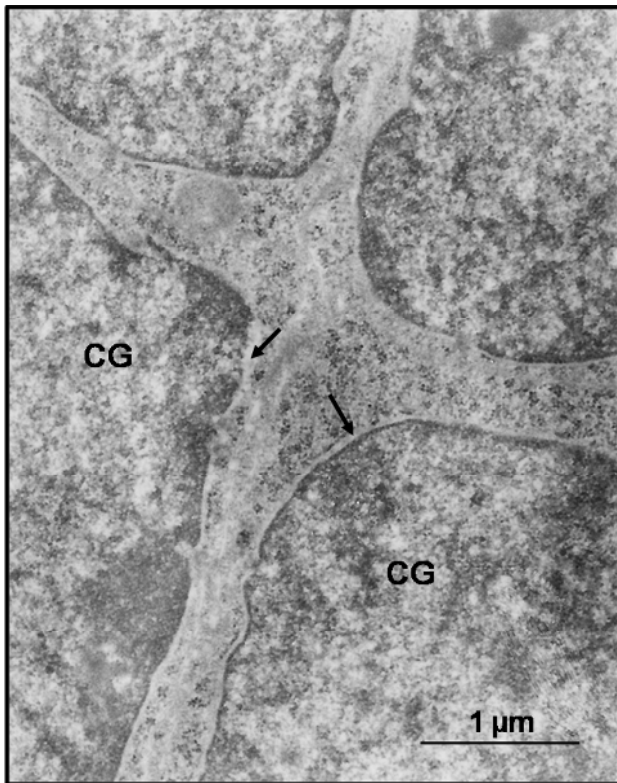
observa un proceso de necrosis que compromete la integridad del citoplasma de tres células granulares (CG) adyacentes y una dilatación de la envoltura nuclear de estas células (Fig. 7).



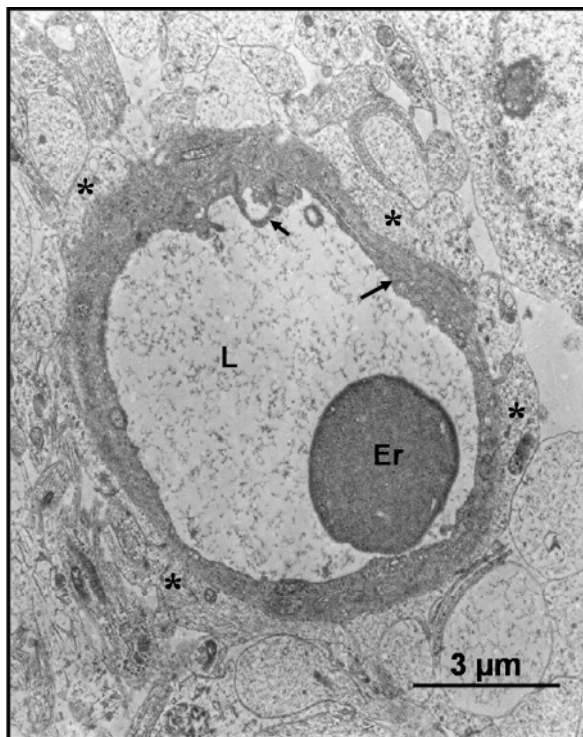
**Fig. 7.** Micrografía electrónica de capa granular interna. Se observa un proceso de necrosis que afecta a varias células granulares. Se aprecia la membrana nuclear distendida (flecha) y vacuolas (V).

En otro ejemplar del mismo tratamiento, se pudo constatar una zona similar con una estructura citoplasmática, aparentemente, en buen estado, pero persiste la envoltura nuclear ligeramente distendida (Fig. 8). En la retina, tejido neural que forma parte del SNC, también se observaron procesos necróticos caracterizados por la presencia de células con numerosas vacuolas, núcleos pignóticos, ruptura de membrana plasmática y distensión de la envoltura nuclear en ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia postnatal [6,7]. La toxicidad del sistema nervioso central se debe principalmente a la oxidación y polimerización de los grupos sulfhidrilos de las enzimas que conducen a su inactivación, lo que, a su vez, da lugar a daño celular [24].





**Fig. 8.** Micrografía electrónica de capa granular interna. Se observa envoltura nuclear distendida (flecha) de células granulosas.



**Fig. 9.** Micrografía electrónica de un capilar de capa granular de la corteza cerebelosa de una rata control de P6. Se observa célula endotelial (flecha larga), luz del capilar (L), proyección del endotelio (flecha corta), pie de las prolongaciones de los astrocitos perivasculares (\*).

En la CGI del cerebelo de un animal control P6, se observa un capilar constituido por células endoteliales de grosor uniforme lo que conlleva a la formación de un conducto capilar amplio y sin obstrucciones (Fig. 9). La membrana basal y el pericito se observan normales. Por otro lado, los pies de los astrocitos perivasculares, un componente esencial para el buen funcionamiento de la barrera hematoencefálica (BHE) tienen la forma aplanada característica. En contraste, en el grupo expuesto a una hiperoxia hasta P6 se puede constatar una disminución del diámetro de sección de los capilares como consecuencia de edema de la célula endotelial, pliegues del citoplasma del endotelio vascular hacia la luz del capilar y edematización de los pies de los procesos astrocíticos perivasculares (Fig. 10). La gran cantidad de pliegues del citoplasma de las células endoteliales aparte de mostrar la hiperactividad del endotelio capilar, también colaboran con el proceso de vaso obliteración y a la sucesiva formación de vesículas pinocíticas de gran tamaño que favorecerán a la edematización de las células endoteliales del capilar y una subsecuentemente inflamación en toda el área perivascular. Muy posiblemente, la vaso obliteración sea una respuesta que favorezca a la regulación del flujo de sangre y la oxigenación excesiva del tejido circundante. Probablemente, la edematización de los procesos astrocíticos perivasculares se deba a este fenómeno. Cambios patogénicos en el SNC son frecuentemente acompañados de la pérdida de las propiedades de la BHE resultando en edema cerebral [25]. Además, el daño o la remoción de los astrocitos *in vivo* resultan en el incremento transitorio de la permeabilidad de la BHE [25]. Posiblemente, la obliteración de los capilares sea una respuesta a la hiperoxia para la preservación de la homeostasis tisular. La exposición a sustancias que incrementan los niveles de calcio en el pericito, induce a la contracción vascular con una consecuente disminución del diámetro del lumen capilar [26, 27]. Procesos de edema capilar e hiperactividad en el endotelio capilar

fueron observados en la retina de ratas expuestas a hiperoxia postnatal durante 9 días [7]. La retina y el cerebelo de la rata son altamente inmaduros al nacimiento. Esta extrema inmadurez hace que estos tejidos sean muy susceptibles a los daños directos del O<sub>2</sub>.



**Fig. 10.** Capilar de la capa granular de la corteza cerebelosa de una rata expuesta a hiperoxia hasta P6. Se observa célula endotelial (estrella), núcleo (N), luz del capilar (L), proyecciones del endotelio (flecha corta), y pie de los astrocitos perivasculariales.

## CONCLUSIONES

La hiperoxia postnatal es capaz de producir muerte celular por apoptosis y necrosis, además de edema endotelial con la obliteración de los capilares en el cerebelo de ratas en desarrollo. Estos hallazgos son similares a los encontrados en el cerebro y la retina. Con este estudio se corrobora el efecto dañino de la hiperoxia postnatal para las neuronas del cerebelo de un prematuro en los primeros días de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), EL Consejo de Investigación del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente (CINS-UDO) y el Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente “*Dra. Susan Tai*” (IIBCA-UDO).

## REFERENCIAS

- [1] Felderhoff-Mueser U., Siffringer M., Polley O., Dzierko M., Leineweber B., Mahler L., Baier M., Bittigau P., Obladen M., Ikonomidou C., Buehrer C. (2005) “Caspase-1-Processed Interleukins in Hypoxia-Induced Cell Death in the Developing Brain”. *Ann. Neurol.* 57:50-59.
- [2] Felderhoff-Mueser U., Siffringer M., Jarosz B., Korobowicz E., Mahler L., Piening T., Moysich A., Grune T., Thor F., Heumann R., Bührer C., Ikonomidou C. (2004) “Oxygen causes cell death in the developing brain”. *Neurobiol Dis.* 17:273-282.
- [3] Yiş U., Hiz S., Kumral A., Cilaker S., Tuğyan K., Genç S., Yilmaz O. (2008) “Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain” *Brain & Development.* 30: 556-562.
- [4] Lachapelle P., Dembinska O., Rojas L., Benoit J., Almazan G., Chemtop S. (1999) “Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia”. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology.* 77: 1-8.
- [5] Dembinska O., Rojas L.M., Varma D., Chemtop S., Lachapelle P. (2001) “Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats”. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 1111-18.
- [6] Rojas L., Suárez S., Lemus M., Benítez K., Ramírez Y., Mitchell M. y Boada-Sucre A. (2004) “Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia”. *Interciencia.* 29 (10): 556-561.
- [7] Rojas L., Suárez S., Benítez K., Boada-Sucre A., Ramírez Y, Romero M.A., Hernández G. (2005) “Ultraestructura de la retinopatía causada por la hiperoxia en ratas en desarrollo”. *Rev. Inves. Clí.* 57: 794-801.
- [8] Schmitz T., Ritter J., Mueller S., Felderhoff-Mueser U., Chew L., and Gallo V. (2011) “Cellular changes



- underlying hyperoxia-induced delay of white matter development". *J Neurosci.* 31(11): 4327-4344.
- [9] Dox I., Melloni B.J., Eisner G., Melloni J. (2006) "Harper Collins de bolsillo ilustrado diccionario médico" Madrid, España, Marbán, pp. 170.
- [10] Clos J., Favre C, Selme-Matrat, M, Legrand J. (1977) "Effects of undernutrition on cell formation in the rat brain and specially on cellular composition of the cerebellum". *Brain Research.* 123: 13-26.
- [11] Wocadlo C., Rieger I. (2008) "Motor impairment and low achievement in very preterm children at eight years of age". *Early Hum Dev.* 84:769-776.
- [12] Kuan C.Y., Roth K.A., Flavell R.A., Rakic P. (2000) "Mechanisms of programmed cell death in the developing brain". *Trends Neurosci.* 23: 291-297.
- [13] Majno G., Joris I. (1996) "Cells, tissues and disease: principles of general pathology". Cambridge, Mass.: Blackwell Science, pp. 175-227.
- [14] Ward N.S., Waxman A.B., Homer R.J. (2000) "Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury". *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22:535-542.
- [15] Pagano A., Barazzone-Argiroffo C. (2003) "Alveolar cell death in hiperoxia-induced lung injury" *Ann NY Acad Sci.* 1010: 405-416.
- [16] Sifringer M., Bendix I., Börner C., Endesfelder S., Von Haefen C., Kalb A., Holifanjaniana S., Prager S., Schlager GW., Keller M., Jacotot E., Felderhoff-Mueser U. (2012) "Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis" *Cell Death and Disease;* 3, e250; doi:10.1038/cddis.2011.133.
- [17] Almaguer D., Almaguer L.E. (2006) "Estrés oxidativo y muerte neuronal. "Una visión biomolecular". *Rev Mex Neuroc.* 7(4): 330-337.
- [18] Zhang K., Kaufman R.J. (2008) "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response". *Nature* 454(7203): 455-462.
- [19] Papp B., Brouland J.P. (2011) "Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis". *Breast cancer: basic and clinical research.* 5: 163-174.
- [20] Schousboe A, Frandsen A, Wahl P, Krogsgaard-Larsen P. (1991) "Excitatory amino acid-induced cytotoxicity in culture neurons: role of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis". In: *Glutamate Cell Death and Memory* (Ascher P, Choi DW, and Christen Y, Eds.). Heidelberg: Springer-Verlag; pp. 137-152.
- [21] Frandsen A., Schousboe A. (1993) Excitatory amino acid-mediate cytotoxicity and calcium homeostasis in culture neurons. *J Neurochem;* 60: 1202-11.
- [22] Garner A. (1990) "The role of hyperoxia in the aetiology of retinopathy of prematurity". *Doc. Ophthalmol.* 74: 187-193.
- [23] Ramírez C., Carracedo J., Moreno C., Guerra F. (1999) "Apoptosis y enfermedad". *Alergol. Inmunol. Clin.* 14: 367-374.
- [24] Sánchez C.R., Peñaranda S.D., Rivera P.L., Mendivil, B.E. (2011) *Cómo puede ser tóxico el oxígeno en el periodo neonatal. Precop SCP. CCAP.* 9 (4):35-42.
- [25] Hamm S., Dehouck B., Kraus J., Wolburg-Buchholz K., Wolburg H., Risau W., Cecchelli R., Engelhardt B., Dehouck M.P. (2004) "Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts". *Cell Tissue Res.* 315:157-66.
- [26] Edelman D.A., Jiang Y., Tyburski J., Wilson R.F., Steffes C. (2006) "Pericytes and their role in microvasculature homeostasis". *J. Surg. Res.* 135:305-311.
- [27] Hughes S., Gardiner T., Hu P., Baxter L., Rosinova E., Chan-Ling T. (2006) "Altered pericyte-endothelial relations in the rat retina during aging: implications for vessel stability". *Neurobiol. Aging.* 27:1838-1847.