

Efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas

Jimena Quinzaños-Fresnedo,* Roberto Coronado-Zarco,** Emilio Arch-Tirado,***
Antonio Verduzco-Mendoza,*** Griselda Del Valle-Cabrera, & Alfonso Alfaro-Rodríguez^o

Resumen

Introducción: La encefalopatía hipóxico-isquémica es causa de discapacidad en la población infantil. Uno de los modelos animales más utilizados en la encefalopatía hipóxico-isquémica en cerebro inmaduro es la preparación de Levine aplicada por Rice en ratas neonatas, que consiste en la ligadura de la arteria carótida común izquierda e hipoxia. El objetivo de esta investigación fue estudiar los efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas.

Material y métodos: Se utilizaron cinco ratas control, cinco ratas sham y cinco ratas con lesión hipóxico-isquémica mediante la aplicación de la preparación de Levine a los siete días de edad. A los 42 días se evaluaron todas las ratas mediante el tiempo de agarre de una varilla, la prueba del reflejo posterior y el análisis de la actividad locomotora espontánea (bipedestación, número de casillas pisadas, tiempo de acicalado).

Resultados: El grupo con lesión presentó menor tiempo de agarre, menor número de respuestas adecuadas en el reflejo posterior y menor número de casillas pisadas ($p=0.024$, 0.002 y 0.0001 , respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de acicalado ni en el número de bipedestaciones.

Conclusión: Las ratas neonatas en quienes se aplicó la preparación de Levine tuvieron alteraciones clínicas que pueden semejar algunos de los signos que acompañan a la parálisis cerebral infantil (problemas en prensión, respuesta a reflejos posturales y locomoción).

Palabras clave: Encefalopatía hipoxia, isquemia, ligadura de carótida.

Summary

Background: Hypoxic-ischemic encephalopathy is a cause of disability in the infantile population. One of the most used animal models in the hypoxic-ischemic encephalopathy in immature brain is the preparation of Levine applied by Rice in newborn rats and consists of the bond of the left common carotid artery followed by induced hypoxia. The objective of this investigation was to study the neurological effects of the bond of the left common carotid and induced hypoxia in newborn rats.

Methods: Five control rats, five sham rats and five rats with hypoxic-ischemic lesion by means of the application of Levine's preparation at 7 days of age were used. On day 42 all rats were evaluated by means of the time of grasping, the test of the posterior reflex and analysis of the spontaneous locomotor activity (number of biped stations, number of stepped stalls, grooming time).

Results: The group with lesions presented less grasping time, less number of positive responses to the posterior reflex and lower number of stepped stalls ($p=0.024$, 0.002 and 0.0001 , respectively). There were no statistically significant differences in grooming time or number of biped stations.

Conclusion: Newborn rats in whom Levine preparation was applied presented clinical alterations that may resemble some of signs that accompany infantile cerebral palsy (grasp problems, wrong answer to postural reflexes and alteration in locomotion).

Key words: Encephalopathy, hypoxia, ischemia, carotid ligature.

Introducción

La encefalopatía neonatal ocurre en uno a seis de cada 1000 recién nacidos de término, y es una de las principales causas de discapacidad en el neurodesarrollo;¹ 25 % de los pacientes que sobreviven a la encefalopatía neonatal presentan déficit clínico permanente, particularmente motor y cognitivo, que representa a la parálisis cerebral infantil (PCI).² El avance en los cuidados intensivos neonatales ha sido un factor determinante en el aumento de la frecuencia de esta patología, debido a la viabilidad temprana de los productos.³ En Estados Unidos se informa una incidencia de PCI moderada y severa de 2.5 por mil nacidos vi-

* Médico especialista en Medicina de Rehabilitación.

** Servicio de Rehabilitación de Columna.

*** Laboratorio de Bioacústica.

& División de Rehabilitación Pediátrica.

○ Investigación Básica y Aplicada.

Instituto Nacional de Rehabilitación.

Solicitud de sobretiros: Jimena Quinzaños-Fresnedo, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Deleg. Tlalpan, México D. F. E-mail: jimenaqf@hotmail.com

Recibido para publicación: 22-05-2007

Aceptado para publicación: 23-07-2007

vos.⁴ En México, para 1995 habían 2 121 365 personas con PCI, con una tasa nacional para el grupo de seis a 12 años de 11.55 por cada mil habitantes.⁵ De acuerdo con el programa de prevención y rehabilitación de la discapacidad (PeverR-DIS), la incidencia anual de discapacidad por PCI es de 12 mil. El compromiso del personal médico y paramédico es la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de esta patología, así como la propuesta y el diseño de nuevas técnicas terapéuticas.²

El uso y producción de modelos animales en la investigación científica biomédica tienen como finalidad esclarecer los mecanismos básicos del mantenimiento, pérdida y restablecimiento de la salud. Los modelos de lesión hipóxico-isquémica prenatal/neonatal se han utilizado desde hace más de 20 años, y se han realizado revisiones periódicas de los mismos con el objetivo de generar información relacionada con la variedad, la frecuencia de uso y lo apropiado de los modelos animales en especies grandes y pequeñas para el estudio de lesión cerebral en el periodo perinatal.^{6,7}

Son pocas las investigaciones que describen un verdadero modelo de lesión hipóxico-isquémica intrauterina. El modelo en ovejas de hipoxemia materna^{8,9} o de oclusión de cordón umbilical^{10,11} ha sido el más estudiado; este modelo presenta algunas desventajas, ya que las ovejas gestantes son costosas y se requiere un espacio grande para su cuidado y manutención; si sobreviven, las crías suelen tener poca evidencia clínica de daño neurológico, lo que limita su seguimiento a largo plazo.⁶ Finalmente, no se ha realizado una adecuada transpolaración del neurodesarrollo entre las ovejas y el humano.¹²

Recientemente se ha descrito un modelo de lesión cerebral perinatal en conejos pre témino; en este trabajo se simula una insuficiencia placentaria observada en humanos donde los recién nacidos que sobreviven presentan hipertensión persistente y déficit motor que se asemejan las manifestaciones clínicas de la PCI.¹³ Se han publicado estudios bioquímicos del modelo que sugieren posibles mecanismos fisiopatológicos de la lesión nerviosa.^{14,15} Un estudio comparativo del neurodesarrollo entre especies demuestra que la etapa neurológica de un conejo de 22 días de gestación, periodo en la que se realiza la lesión hipóxico-isquémica en el modelo, corresponde a la de un humano de 16 a 18 semanas de gestación.¹² La técnica experimental es difícil y requiere equipo y material sofisticado, ya que la isquemia uterina se logra mediante la colocación de un catéter arterial de embolización en la arteria uterina del conejo gestante, con monitoreo de la presión sanguínea en la extremidad inferior mediante un miniDoppler.¹⁴

Cai y colaboradores (2000)¹⁶ desarrollaron un modelo de lesión en fetos de rata mediante la administración materna de un lipopolisacárido. El modelo demostró que puede ser apropiado para explorar los mecanismos involucrados en los efectos neurológicos de la infección materna, aunque no existen más estudios que lo utilicen.

Uno de los modelos más recientes es en ratones al día 15 de gestación (que corresponde a la semana 28 a 29 de gestación en

el humano), con inflamación intrauterina localizada mediante la aplicación de un lipopolisacárido en el cordón umbilical.¹⁷ El modelo es técnicamente difícil y no ha sido replicado. Sin embargo, tiene la ventaja de poder ser utilizado en ratones transgénicos, que cada día son más empleados.⁶

En cuanto a la lesión hipóxico-isquémica en animales neonatos, se han estudiado principalmente modelos en especies pequeñas. Algunos autores argumentan que las ratas son menos apropiadas que otros animales para los modelos sintomáticos de la enfermedad neurológica, sin embargo, el análisis comparativo de la mecánica del movimiento en las ratas y los primates no humanos y humanos muestra similitud en varios patrones.¹⁸

Rice (1981) fue el primero en utilizar la preparación de Levine para producir un modelo de lesión hipóxico-isquémica en un cerebro inmaduro de rata. El modelo consiste en la ligadura de la carótida común izquierda seguida de un periodo de una hora y media en un ambiente hipóxico en ratas de siete días de vida. Esta edad en la rata es equiparable a una edad gestacional de 26-28 semanas en el humano.^{6,12} Existen varios estudios de revisión de este y otros modelos relacionados.^{6,7,19-23} Este modelo ha permitido esclarecer algunos mecanismos fisiopatológicos que llevan a lesión nerviosa hipóxico-isquémica en el cerebro inmaduro.^{6,7} En particular se ha dado un papel importante a las cascadas de la inflamación, la coagulación y el complemento, como parte de los procesos que originan este tipo de lesión nerviosa.^{24,25} Se ha demostrado también una sobreexpresión de receptores de AMPA y NMDA, inducida por la producción de un grupo de proteínas recientemente descritas llamadas pentrexinas.²⁶ Una de las características más importantes del modelo es que ha sido la base para la investigación de alternativas terapéuticas en la prevención del daño neurológico en humanos.^{20,27,28} El uso de hipotermia en niños con encefalopatía hipóxico-isquémica con el modelo de Rice ha demostrado disminuir la mortalidad y las alteraciones en el neurodesarrollo.²⁹⁻³² El modelo también ha sido utilizado para la investigación del manejo con estatinas³³ y cicloheximida³⁴ en ratas neonatas. Los resultados son prometedores, sin embargo, aún falta hacer pruebas con humanos.

El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas.

Material y métodos

Animales

Para formar los grupos de estudio se utilizaron tres ratas Wistar gestantes alojadas en el bioriterio del Instituto Nacional de Rehabilitación en jaulas de acrílico de 50 × 30 × 15 cm, con un periodo de luz-oscuridad de 12 horas, iniciando la luz a las 8:00 horas. La temperatura ambiente se mantuvo a 22 ± 2 °C. Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Los animales empleados fueron intervenidos conforme los lineamientos para uso y cuidado de los animales de experimentación y como lo señala la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Se obtuvieron 24 crías de siete días de edad, de ambos sexos, que se dividieron aleatoriamente en tres grupos: cinco ratas control sin cirugía; cinco ratas sham o cirugía en falso, con cirugía y sin daño hipóxico-isquémico; cinco ratas con daño hipóxico-isquémico. Se incluyeron la misma cantidad de machos y hembras en los grupos para evitar sesgos asociados con el sexo.

Lesión hipóxico-isquémica

Se provocó daño hipóxico-isquémico en las ratas neonatas de acuerdo con la técnica empleada por Rice (1981).³⁵ Al día 7 de nacimiento, las ratas se anestesiaron con ketamina (0.5 mg/kg), se hizo una incisión en cuello en la línea media de 0.5 cm de longitud. Se disecaron los músculos rectos anteriores del cuello para localizar la tráquea y a su izquierda la arteria carótida común izquierda. Se ligó la arteria con vicryl 5-0 y se cortó. Posteriormente los animales se mantuvieron en recuperación durante una a dos horas, para colocarlas después por 100 minutos en una caja de 50 × 30 × 15 cm con una llave para la entrada de una mezcla comercial de gas con 7.7 % de oxígeno en nitrógeno y una llave para la salida del mismo a un flujo constante. Las ratas del grupo control de operación en falso fueron anestesiadas con ketamina a 0.5 mg/kg y se hizo una incisión de la piel del cuello en la línea media de 5 mm de longitud para localizar la arteria carótida común izquierda, que no se manipuló, y se suturó la piel con un punto de vicryl 5-0.

Evaluación neurológica

A los 42 días de edad, un mismo observador realizó la valoración clínica que consistió en las siguientes pruebas:



Figura 1. Capacidad de agarre de las patas delanteras.

Evaluación de la capacidad de agarre de las patas delanteras midiendo el tiempo que la rata se mantiene sujetada de una varilla de metal de 0.5 cm de diámetro a 80 cm de la mesa^{35,36} (figura 1).

La prueba del reflejo posterior consistió en medir el número de respuestas normales en 10 repeticiones. La rata se sostiene de la cola a 50 cm de la mesa y se realiza un movimiento rápido hacia la mesa. Una respuesta normal es la extensión de las patas delanteras hacia la mesa. Una respuesta inadecuada es cuando la rata flexiona una de las patas delanteras o la mitad del cuerpo³⁵⁻³⁷ (figura 2).

Finalmente, se evaluó la actividad locomotora espontánea filmando durante 15 minutos en un espacio determinado de 100 × 60 × 30 cm. En el análisis del video se contó tiempo de acicalado (lavado del cuerpo por ellas mismas), número de bipe destaciones y de casillas pisadas.³⁷

Ánálisis estadístico

Se determinó el tipo de distribución de los datos y los resultados con una distribución no normal se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que los que presentaron una distribución normal se analizaron con la prueba de Bonferroni.³⁸

Resultados

De las nueve ratas neonatas lesionadas, dos murieron durante la hipoxia y dos fueron devoradas por su madre. Las cinco restantes fueron evaluadas clínicamente a los 42 días de edad. Las cinco ratas control y las cinco ratas con cirugía en falso fueron evaluadas clínicamente a los 42 días de edad.

El peso de las ratas no siguió una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0.05$). De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, los pesos promedio de los tres grupos no fueron significativamente diferentes ($p = 0.36$) y, aunque los grupos estu-



Figura 2. Respuesta alterada al reflejo posterior.

Cuadro I. Promedio de peso por grupo y sexo

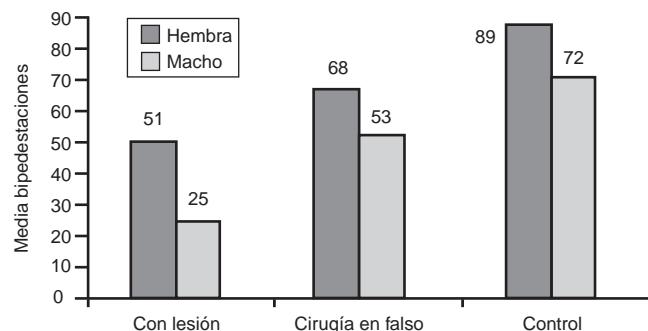
Grupo	Sexo	Media	Desviación típica	n
Con lesión	Hembra	133.3333	5.7735	3
	Macho	135.0000	7.0711	2
	Total	134.0000	5.4772	5
Cirugía en falso	Hembra	130.0000	0.0001	3
	Macho	140.0000	0.0001	2
	Total	134.0000	5.4772	5
Control	Hembra	136.6667	5.7735	3
	Macho	140.0000	0.0001	2
	Total	138.0000	4.4721	5
Total	Hembra	133.3333	5.0000	9
	Macho	138.3333	4.0825	6
	Total	135.3333	5.1640	15

Se observa la homogeneidad del peso en todos los grupos, sin diferencia significativa.

vieron pareados por sexo, el peso según el sexo no presentó diferencias significativas ($p = 0.06$) (cuadro I).

La potencia estadística para estimar las diferencias de peso entre los grupos según el sexo de las ratas fue de 57.9 %.

Excepto en el tiempo de acicalado, la valoración neurológica de las ratas del grupo con lesión tuvo promedios significativamente menores que los grupos de comparación. En todas las variables, las diferencias entre los grupos de cirugía en falso y de control no fueron significativas. El reflejo posterior no siguió una distribución normal ($K-S = 1.38$, $p = 0.044$), por tal razón se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis (cuadro II).

**Figura 3.** Promedio de bipedestaciones por grupo y sexo de ratas.

Al controlar la posible influencia del peso de las ratas y la diferencia en los promedios de bipedestaciones por grupo, se realizó un análisis de covarianza ($p = 0.09$) para una potencia estadística observada de 67.7 % (cuadro III) (covariable peso: $p = 0.08$; grupo: $p = 0.09$; sexo: $p = 0.023$).

Se presentó mayor frecuencia en la bipedestación en las ratas hembras, este comportamiento posiblemente se debe al menor peso en comparación con los machos (figura 3).

Excepto la variable tiempo de acicalado, que no contribuye a diferenciar los grupos adecuadamente, si se consideran las demás variables como los ítems de una prueba, guardan una estrecha correlación interclase (cuadro IV), con un coeficiente alfa de Cronbach de 0.735 (intervalos de confianza de 95 % desde 0.420 hasta 0.900, $p = 0.0004$); es decir, las mediciones muestran una buena confiabilidad.

Debido a lo anterior, considerando las cuatro variables expuestas en el cuadro IV, el análisis discriminante pronostica que

Cuadro II. Promedio y desviación estándar de las variaciones neurológicas por grupos

Valoración neurológica	Grupo			p
	Con lesión	Cirugía en falso	Control	
Bipedestaciones	40.4 ± 18.5	61.8 ± 12.5	82.2 ± 28.3	1 vs. 2 = 0.39 1 vs. 3 = 0.024* 2 vs. 3 = 0.44
Tiempo de acicalado	149.2 ± 36.1	125.8 ± 18.7	140.4 ± 19.3	1 vs. 2 = 0.54 1 vs. 3 = 1.0 2 vs. 3 = 1.0
Número de casillas	41.2 ± 19.8	65.4 ± 5.1	65.4 ± 3.7	1 vs. 2 = 0.024* 1 vs. 3 = 0.024* 2 vs. 3 = 1.0
Reflejo posterior	3.2 ± 1.3	10.0 ± 0.0	9.8 ± 0.4	0.002*
Tiempo en varilla	8.0 ± 3.6	23.6 ± 3.2	23.0 ± 5.3	1 vs. 2 = 0.0001* 1 vs. 3 = 0.0001** 2 vs. 3 = 1.0

Se observa diferencia del daño neurológico en los animales lesionados en comparación con los controles.

Cuadro III. Promedio de bipedestaciones por grupo y sexo

Sexo	Grupos		
	Con lesión	Cirugía en falso	Control
Hembra	50.6 ± 11.0	67.6 ± 12.6	89.0 ± 37.5
Macho	25.0 ± 18.3	53.0 ± 87.0	72.0 ± 5.6

hasta 80 % de las ratas estarán correctamente clasificadas en sus grupos pertenecientes originales (cuadro V).

No obstante, al incluir el peso de las ratas más las cuatro variables mencionadas, el análisis discriminante predice que hasta 93.3 % quedará correctamente clasificado (cuadro VI).

Discusión

El principal objetivo de este estudio fue estudiar los efectos neurológicos de la ligadura de carótida interna izquierda e hipoxia en ratas neonatas. Clínicamente, las ratas con lesión tuvieron menos movilidad espontánea, más alteraciones en la respuesta al reflejo posterior y permanecieron significativamente menos tiempo en la varilla.

Cabe mencionar que todos los animales lesionados presentaron ptosis moderada del ojo ipsilateral al sitio de la lesión. Esta alteración se debió probablemente a una lesión asociada del nervio simpático pericarotídeo durante la ligadura de la carótida común.³⁹

Los resultados encontrados son similares a los descritos por otros autores.³⁵⁻³⁷ En 1997, Bona y colaboradores estudiaron ratas neonatas a las cuales sometieron a ligadura de una carótida común e hipoxia. Evaluaron periódicamente a las ratas durante el desarrollo mediante el reflejo posterior y encontraron que las ratas con lesión mostraban alteración en la respuesta a diferencia de las ratas control.³⁶

Cuadro IV. Coeficientes de correlación entre las variables de valoración neurológica

	Bipedestación	Número de casillas	Reflejo posterior
Bipedestación	1.000		
Número de casillas	0.652	1.000	
Reflejo posterior	0.635	0.761	1.000
Tiempo en varilla	0.547	0.828	0.913

La correlación más fuerte entre las pruebas neurológicas realizadas fue el tiempo de varilla con reflejo posterior, seguido de tiempo de varilla con número de casillas.

En 2001, Puurunen y colaboradores estudiaron el comportamiento de ratas adultas en las que se había aplicado la preparación de Levine. Estos autores encontraron que el comportamiento espontáneo era diferente al de las ratas control, lo que corresponde con los resultados del presente trabajo.³⁷

En cuanto al número de bipedestaciones, se identificó la tendencia de las ratas con menor peso (hembra) a realizar mayor número de bipedestaciones.

No se demostraron diferencias significativas en el tiempo de acicalado. Estudios previos han demostrado que esta variable se altera principalmente con la edad y el estrés.^{38,40,41} Es conveniente señalar que las ratas del estudio tenían la misma edad y estuvieron sometidas al mismo estrés durante la prueba de la movilidad espontánea, por lo que no resulta sorprendente que no haya habido diferencias estadísticamente significativas en esta variable.

Si se emplea el tiempo en la varilla, el reflejo posterior, el número de casillas y el número de bipedestaciones como una prueba de evaluación neurológica, se obtendrá una clasificación correcta en 80 % de los casos, lo que representa una cifra alta tratándose de una evaluación clínica. Si se incluye el peso de las ratas al análisis, entonces 93.3 % de las ratas quedará correcta-

Cuadro V. Resultados de la clasificación por análisis discriminante

	Grupo	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
		Con lesión	Cirugía en falso	Control	
Original	Recuento	Con lesión	5	0	5
		Cirugía en falso	0	4	5
		Control	0	2	5
	%	Con lesión	100.0	0.0	100.0
		Cirugía en falso	0.0	80.0	100.0
		Control	0.0	40.0	100.0

Clasificados correctamente 80 % de los casos agrupados originales. De acuerdo con los resultados del análisis discriminante, sólo las cinco ratas que originalmente se clasificaron en el grupo con lesión se pronostica que pertenecerán a ese mismo grupo; una del grupo con cirugía en falso pertenecerá al control; de las cinco control, dos pertenecerán al de cirugía en falso.

Cuadro VI. Resultados de la clasificación por análisis discriminante

	Grupo	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
		Con lesión	Cirugía en falso	Control	
Original	Recuento	Con lesión	5	0	5
		Cirugía en falso	0	5	5
		Control	0	1	4
	%	Con lesión	100.0	0.0	0.0
		Cirugía en falso	0.0	100.0	0.0
		Control	0.0	20.0	80.0

Clasificados correctamente 93.3 % de los casos agrupados originales. Las ratas originalmente clasificadas con lesión quedarán en el mismo grupo por compartir las características neurológicas medidas, lo mismo sucede con las cinco ratas con cirugía en falso; sólo una de las cinco ratas control se pronostica que pertenecerán al grupo de cirugía en falso.

mente clasificadas. Así, las pruebas clínicas fueron adecuadas y confiables para la evaluación neurológica de las ratas neonatas en quienes se aplicó la preparación de Levine.

La evaluación de las reacciones posturales constituye una herramienta clave en el diagnóstico temprano de las secuelas neurológicas ocasionadas por lesiones hipóxico-isquémica en un cerebro inmaduro. En pacientes que presentan hemiparesia espástica, las respuestas son asimétricas, con patrón predominantemente flexor en el hemicuerpo afectado.⁴² El reflejo posterior en la rata es un reflejo postural que semeja la prueba de paracaídas que se realiza en los niños y que se presenta entre los seis y nueve meses de edad. En este estudio, la respuesta al reflejo mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con una respuesta predominantemente asimétrica en las ratas con lesión, resultado similar a lo observado en humanos.

Los niños con PCI presentan pocos movimientos espontáneos desde edades tempranas, dependiendo del grado de afección, y más tarde se observan importantes problemas de locomoción.⁴³ En este estudio se demostró que las ratas con lesión tienen menor movilidad que las ratas control, reflejada en el número de casillas pisadas.

Dado que este tipo de lesiones cerebrales no son selectivas y afectan de forma inmediata y global a todo un hemisferio (ligadura de arteria carótida izquierda o derecha), los mecanismos de recuperación funcional y plasticidad cerebral en el periodo neonatal sustentan que las variables analizadas (bipedestación, tiempo de acicalado, número de casillas, reflejo posterior y tiempo en varilla) tienen gran variabilidad en los resultados entre los grupos de estudio.

Como parte del retraso en el desarrollo psicomotor, en los niños con PCI existen alteraciones en la función de la mano secundarias a espasticidad, debilidad y poco control volitivo.^{44,45} El tiempo durante el cual la rata se sostiene de la varilla evalúa indirectamente la función de la mano, por lo que se encuentra una similitud más entre el comportamiento animal y el humano.

Conclusiones

Las ratas neonatas en quienes se aplicó la preparación de Levine presentaron alteraciones clínicas que pueden semejarse a ciertos signos que acompañan a la PCI. A partir de este modelo se podrían desarrollar nuevos trabajos de investigación con la finalidad de comprender mejor la fisiopatología del daño neurológico en la PCI y de desarrollar alternativas terapéuticas para la prevención del mismo.

Referencias

1. González F, Miler S. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2006;91:F454-F459.
2. Vannucci R, Perlman J. Intervention for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-1014.
3. Meberg A, Broch H. Etiology of cerebral palsy. *J Perinatol Med* 2004;32:434-439.
4. Kerr Graham H, Delber P. Musculoskeletal aspects of cerebral palsy. *J Bone Joint Surg* 2003;85:157-166.
5. Arroyave G. Coste-beneficio del tratamiento farmacológico de la parálisis cerebral con espasticidad en México. *Rev Esp Salud Pública* 2000;74:549-559.
6. Northington F. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J* 2006;47:32-38.
7. Aswal S, Pearce W. Animal models of neonatal stroke. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:506-516.
8. Gleason CA, Hamm C, Jones MD Jr. Effect of acute hypoxemia on brain blood flow and oxygen metabolism in immature fetal sheep. *Am J Physiol* 1990;258:H1064-1069.
9. Harris AP, Helou S, Gleason CA, Traystman RJ, Koeehler RC. Fetal cerebral peripheral circulatory responses to hypoxia after nitric oxide synthase inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R382-R390.
10. González H, Hunter CJ, Bennet L, Power GG, Gunn AJ. Cerebral oxygenation during postasphyxial seizures in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:911-918.
11. Lotgering FK, Bishai JM, Struijk PC, Blood AB, Hunter CJ, Oberg KC, et al. Absence of robust ischemic preconditioning by five 1-minute total umbilical cord occlusion in fetal sheep. *J Gynecol Invest* 2004;11:449-456.

12. Clancy B, Darlington B, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 2001;105:7-17.
13. Derrick M, Luo NL, Bregman JC, Jilling T, Ji X, Fisher K, et al. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model of human cerebral palsy? *J Neurosci* 2004;24:24-34.
14. Derrick M, Brady E, Tan S. The in-vitro fate of rabbit fetal brain cells after acute in vivo hypoxia. *J Neurosci* 2001;21:RC138.
15. Tan S, Bose R, Derrick M. Hypoxia-ischemia in fetal rabbit brain increases reactive nitrogen species production: quantitative estimation of nitrotyrosine. *Free Radical Biol Med* 2001;30:1045-1051.
16. Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes P. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 2000;47:64-72.
17. Elovitz MA, Mrinalini C, Sammel M. Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth. *Pediatr Res* 2006;59:50-55.
18. Cenci A, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature Rev Neurosci* 2002;3:574-579.
19. Tuor UI, Del Bigio MR, Chumas PD. Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996;8:159-193.
20. Volpe J. Brain injury in the premature infant—from pathogenesis to prevention. *Brain Dev* 1997;19:519-534.
21. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158-163.
22. Vexler ZS, Ferreiro DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6:99-108.
23. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Seminar Pediatr Neurol* 2004;11:31-46.
24. Cowell R, Plane JM, Silverstein FS. Complement activation contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Neurosci* 2003;23:9459-9468.
25. Cowell R, Xu H, Galasso JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1a expression in immature rat brain. *Stroke* 2002;33:795-801.
26. Hossain MA, Russell JC, O'Brien R, Laterra J. Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain. *J Neurosci* 2004;24:4187-4196.
27. Baud O. Postnatal steroid treatment and brain development. *Arch Dis Child Fetal Neonatol* 2004;89:96-100.
28. Gunn AJ. Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:111-115.
29. Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, et al. The effect of prolonged modification of cerebral temperature on outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatr Res* 1996;217:1193-1199.
30. Battin MR, Penrice J, Gunn TR, Gunn AJ. Treatment of term infants with head cooling and mild systemic hypothermia (35°C and 34.5°C) after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2003;111:244-251.
31. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574-1584.
32. Battin, MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001;107:480-484.
33. Balduini W, Mazzoni E, Carloni S, DeSimoni MG, Pereg C, Sironi L, et al. Prophylactic but not delayed administration of simvastatin protects against long-lasting cognitive and morphological consequences of neonatal hypoxic-ischemic brain injury, reduces interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α mRNA induction, and does not affect endothelial nitric oxide synthase expression. *Stroke* 2003;34:2007-2012.
34. Park WS, Sung DK, Kang S, Koo SH, Kim YJ, Lee JH, et al. Therapeutic window for cycloheximide treatment after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Korean Med Sci* 2006;21:490-494.
35. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-141.
36. Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 1997;42:678-683.
37. Puurunen K. The effects of pharmacotherapy and training on functional recovery after global and focal cerebral ischemia in rats. *Department of Neurology Series of Reports* 2001;58.
38. Hori Y, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Differentiation of the inhibitory effects of calcium antagonists on abnormal behaviors induced by methamphetamine or phencyclidine. *Pharmacology* 1998;56:165-174.
39. Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol* 1990;81:578-587.
40. Renner MJ, Pierre PJ. Development of exploration and investigation in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J Gen Psych* 1998;125:270-291.
41. Isaacson RL, Green EJ. The effect of ACTH1-24 on locomotion, exploration, rearing, and grooming. *Behav Biol* 1978;24:118-122.
42. Zafeiriou D. Primitive reflexes and postural reactions in the neurodevelopmental examination. *Pediatr Neurol* 2004;31:1-8.
43. Einspierer C, Cioni G, Paolicelli PB, Bos AF, Dressler A, Ferrari F, et al. The early markers for later dyskinetic cerebral palsy are different from those for spastic cerebral palsy. *Neuropediatrics* 2002;33:73-78.
44. Eliasson AC, Forssberg H, Hung YC, Gordon AM. Development of hand function and precision grip control in individuals with cerebral palsy: a 13-year follow-up study. *Pediatrics* 2006;118:e1226-e1236.
45. Fedrizzi E, Pagliano E, Andreucci E, Oleari G. Hand function in children with hemiplegic cerebral palsy: prospective follow-up and functional outcome in adolescence. *Dev Med Child Neurol* 2003;45:85-91.