

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD

HOSPITAL DE PEDIATRÍA UNIDAD DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO NEONATÓLOGO

**“EFECTO DE LA CAFEÍNA EN EL DESARROLLO DE LA
CORTEZA CEREBELAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN
RATA NEONATO SOMETIDAS A AMBIENTE HIPERÓXICO”**

Tesista: Dra. Paola Rábago Domingo.

Tutor de tesis: Dra. en Cs. María de Lourdes Lemus Varela.

Asesor metodológico: Dra. en Cs. Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza.

Lugar de realización: Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco Julio 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

2.- Identificación de los autores

Tesista:

- **ME Dra. Paola Rábago Domingo**, Residente de segundo año de Neonatología, Departamento de Neonatología, Hospital de Pediatría, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México. Tel: (+52) 33 36683000 y 36 17 00 60, ext 31729, email: rabagopaola@gmail.com

Tutor de tesis e investigador responsable:

- **Dra. en Cs. María de Lourdes Lemus-Varela**, Departamento de Neonatología, Hospital de Pediatría, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México. Tel: (+52) 33 36683000 y 36 17 00 60, ext 31729. email: lulalemus@hotmail.com

Asesor metodológico:

- **Dra. en Cs. Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza**, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Tel: (+52) 33 36 17 00 60 ext 31950, email: bltorres1@hotmail.com

Investigadores asociados:

- **Dr. en Cs. Genaro Gabriel Ortiz**, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Tel: (+52) 33 36 17 00 60 ext 31950
- **MVZ MSc David Zeferino García Martínez**, División de Clínica Quirúrgica, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Tel: (+52) 33 36 17 00 60 ext 31935 email: davidgarcia@gmail.com
- **Biol. David Alejandro Carbajal Uribe**, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Tel: (+52) 33 36 17 00 60 ext 31950, email: biólogo_david@hotmail.com

Lugar de Desarrollo de la Investigación: Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco México.

Tipo de investigación: Biomédica

Índice

1. Título.....	1
2. Identificación de los autores.....	2
3. Resumen	5
4. Marco teórico.....	9
5. Antecedentes.....	16
6. Planteamiento del problema.....	18
7. Justificación.....	19
8. Hipótesis	20
9. Objetivos.....	21
10. Material y métodos.....	22
Diseño de estudio.....	22
Universo de estudio.....	22
Criterios de inclusión.....	22
Criterios de exclusión.....	22
Calculo muestral.....	22
Descripción general	22
Definición de variables.....	24
Análisis estadístico.....	26
11. Aspectos éticos.....	27
12. Recursos y financiamiento.....	28
13. Resultados.....	30
14. Discusión.....	37
15. Conclusiones.....	41
16. Referencias bibliográficas.....	42

17. Anexos	45
Cronograma de actividades.....	45
Constancia cafeína.....	46
Constancia CIBO.....	47
Constancia aceptación del proyecto.....	48
Hoja de datos	49
Glosario de abreviaturas	50

3.- Resumen

Título: Efectos de la cafeína en el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico.

Antecedentes: La cafeína es una metilxantina utilizada ampliamente en los recién nacidos pretérmino (RNP) en las unidades de cuidados intensivos neonatales de todo el mundo, como abordaje terapéutico de la apnea de la prematuridad, la cual se presenta en el 85% de los menores de 34 semanas de gestación y su incidencia es inversamente proporcional a la edad gestacional (EG). La cafeína actúa inhibiendo los receptores de adenosina, estimula la respiración, reduce la frecuencia de apneas, la necesidad de ventilación mecánica y la incidencia de la displasia broncopulmonar (DBP), patología respiratoria más frecuente en los RNP sobrevivientes que contribuye considerablemente en la morbilidad y mortalidad de este vulnerable grupo de pacientes; la dosis estándar de cafeína recomendada no siempre es suficiente para controlar los episodios de apnea, en muchos casos es necesario repetir la dosis de impregnación y/o elevar la dosis de mantenimiento, lamentablemente tiene múltiples efectos sistémicos y existe preocupación por el riesgo neurológico potencial, particularmente por la inhibición de los receptores de adenosina, debido a que esta preserva los niveles de ATP cerebral, por otro lado la administración de cafeína incrementa el volumen minuto, disminuye la presión parcial de bióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) y consecuentemente el flujo sanguíneo cerebral afectando estructuras vulnerables como cerebelo.

Es riesgo de desarrollar secuelas neurológicas en los RNP es elevado, mayormente presentan alteraciones neuro-conductuales y motoras; hasta hace poco las lesiones supratentoriales cerebrales fueron consideradas la principal causa, recientemente se ha encontrado evidencia que el daño cerebelar se asocia a profundas secuelas en el neurodesarrollo de los RNP sobrevivientes, la complejidad y prolongada fase del desarrollo cerebelar lo convierten en un órgano altamente vulnerable.

En los últimos años se ha incrementado la sobrevida de los RNP, en general presentan amplia morbilidad relacionada con la prematurez y una de las estrategias terapéuticas empleadas en las salas de cuidados intensivos neonatales es la administración de cafeína desde los primeros días de edad postnatal, actualmente se propone su administración en forma profiláctica, sin embargo poco conocemos acerca de sus efectos en la corteza del cerebelo inmaduro; el periodo perinatal es crucial y decisivo en el correcto desarrollo ontogénico y repetidas dosis de cafeína pueden desencadenar

procesos neuroquímicos que alteren el desarrollo neurológico, particularmente en estructuras cerebelares.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la administración temprana de cafeína sobre el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico?

Objetivo: Evaluar el efecto de la administración de cafeína en el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico.

Material y métodos: Experimento controlado, aleatorizado y cegado. Se aparearon 5 ratas Wistar, sus crías se integraron en 3 grupos al azar (n=8 crías por grupo). Grupo 1. control negativo sin oxígeno y sin intervención. Grupo 2. cafeína a partir del día 1 de edad postnatal (EP) se administró cafeína y grupo 3. cafeína + oxígeno, se garantizó el nacimiento en ambiente hiperóxico (FiO₂: 0.8), hasta el día 7 de EP para emular al RNP y a partir del día 1 de EP se administró cafeína. La cafeína se administró vía oral, impregnación a 20 mg/Kg y del día 2 al 14 de EP a 5 mg/Kg. Las crías se pesaron todos los días antes de la administración de cafeína y fueron sacrificadas el día 15 de EP, se preservaron los cerebros en paraformaldehído al 3%, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 4µ con micrótopo (American Optical ®), se montaron en portaobjetos codificados con lápiz de punta de diamante y posteriormente se tiñeron, para observación, análisis y lectura por tres neuropatólogos, quienes ignoraban a qué grupo pertenecían las laminillas. Se evaluó el grosor de la capa granular externa (CGE), capa molecular (CM) y se cuantificaron las células en migración así como las características de la citoarquitectura de la corteza cerebelosa de los diferentes grupos de estudio.

Análisis estadístico: Se describen las medias y desviaciones estándar (DE) se compararon con un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente una prueba posthoc. Se consideró significancia estadística cuando el valor de p fue < 0.05 con intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 22.

Recursos e infraestructura: El financiamiento de este proyecto se realizó por el CIBO IMSS y los investigadores participantes. El bioterio de esta institución contó con todas las condiciones necesarias para su realización.

Experiencia del grupo: Todos los integrantes en esta investigación han implementado un modelo similar en ratas, demostrando experiencia en su manejo. La Dra. en Cs. Blanca Miriam Torres Mendoza ha participado en proyectos con la implementación de un modelo experimental de ratas. El

Dr. Genaro Gabriel, ha participado en los estudios histopatológicos en ratas. El MVZ David García es experto en el manejo quirúrgico de pequeñas especies. El Biólogo David Alejandro Carbajal ha participado en la disección y en el modelo hiperóxico. En la implementación del modelo teórico neonatal la investigadora principal la Dra. en Cs. Lourdes Lemus Varela que ha realizado varios estudios en modelos de rata y DBP. El grupo de trabajo tiene experiencia con anterioridad se ha implementado el modelo.

Resultados: Encontramos retardo en la maduración de la corteza cerebelosa, en las crías que recibieron cafeína; confirmado por el grosor de la CGE: control negativo: $130 \pm 15 \mu\text{m}$; grupo cafeína sin oxígeno: $280 \pm 20 \mu\text{m}$ y grupo cafeína + oxígeno: $180 \pm 18 \mu\text{m}$ de espesor ($p < 0.05$); reducción de la CM: control negativo: $500 \pm 20 \mu\text{m}$; cafeína sin oxígeno: $280 \pm 25 \mu\text{m}$ y cafeína + oxígeno: $440 \pm 22 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$). Encontramos diferencia significativa en el número de hileras de células de la CGE; en el control negativo: 3-4 hileras, en cafeína sin oxígeno: 7-8 hileras y cafeína + oxígeno: 5-6. En una ventana de $600 \mu\text{m}^2$ se cuantificaron las células en migración obteniendo: control negativo: 50 ± 5 células, cafeína sin oxígeno: 83 ± 8 células; cafeína con oxígeno: 72 ± 5 células ($p < 0.05$). Analizamos la capa de células de Purkinje, no encontramos diferencia entre los grupos 1 y 2; pero el grupo cafeína + oxígeno mostró alteraciones que consistieron en: hiper Cromía, displasia, gliosis periférica y necrosis, que reflejan degeneración celular. En relación a los pesos de las crías, se encontró diferencia significativa entre el grupo cafeína + oxígeno y el control ($p < 0.02$).

Discusión: Los cambios en grosor de la CGE y la CM de los 3 grupos tuvieron diferencia con significancia estadística con $p < 0.001$; los grupos expuestos a la cafeína presentaron mayor espesor en la CGE respecto al control, lo cual se correlaciona con menor actividad de migración celular y traduce inmadurez. La CM se encontró con mayor espesor en el grupo control. Estos cambios inversamente proporcionales que sufren las capas de la corteza cerebelar se atribuyen a la interrupción del proceso de migración celular posterior a la exposición de la cafeína. Confirmado por la cantidad de hileras y células en migración que presentaron diferencia con significancia estadística con $p < 0.001$ en los grupos expuestos a cafeína, en contraste con el control.

El desarrollo del cerebelo inicia desde fases tempranas de la gestación, la fase más crítica se lleva a cabo en el tercer trimestre, las células granulosas son las más abundantes, en este periodo cursan con gran actividad de diferenciación, proliferación y especialmente migración, situación de elevada vulnerabilidad a diferentes situaciones ambientales toxicomanías maternas, fármacos, eventos hipoxico-isquémicos, que ocasionan alto riesgo neurológico. Se ha demostrado que la cafeína reduce la frecuencia e intensidad de los episodios de apnea, disminuye la incidencia de la displasia

broncopulmonar, facilita la extubación, sin embargo persiste la preocupación por los potenciales efectos adversos en el sistema nervioso central, en el presente trabajo encontramos alteraciones del proceso de migración celular y sinaptogénesis, cambios estructurales en las células de Purkinje, que en conjunto condicionan hipoplasia y atrofia cerebelar, alterando procesos de conexión cerebro-cerebelo. El grupo expuesto a cafeína + oxígeno presentó dramáticos cambios en la citoarquitectura que reflejan el efecto conjunto de la cafeína y del estrés oxidativo del oxígeno.

Los hallazgos histopatológicos del presente trabajo reflejan que los grupos expuestos a cafeína presentan alteraciones importantes en la citoarquitectura del cerebelo en contraste con el grupo control negativo. Aún quedan muchas preguntas que nos invitan a continuar investigando sobre los efectos de la cafeína y la relación entre función-estructura en el desarrollo del cerebelo.

Conclusiones: La administración temprana de cafeína en el modelo experimental propuesto y con la metodología empleada; altera el proceso de proliferación, diferenciación y migración celular, afectando el desarrollo cerebelar y sus vías de conexión con otras estructuras en contraste con el grupo control, lo cual representa elevado riesgo neurológico. El grupo cafeína + oxígeno presentó alteraciones en las células de Purkinje atribuido a la sinergia entre el estrés oxidativo y la metilxantina administrada.

4.- Marco teórico

Los recién nacidos (RN) se clasifican por edad gestacional de acuerdo a las semanas de gestación (SDG), que se define como el periodo transcurrido desde su concepción hasta su nacimiento, se expresa en semanas lunares y días completos, así mismo, la edad gestacional se puede estimar por métodos clínicos como el Usher, Capurro, Ballard y Ballard modificado para los más prematuros, En forma general se considera recién nacido pretérmino (RNP) al nacimiento antes de las 37 SDG, la organización mundial de la salud; los clasifica en subcategorías :RNP extremos <28 semanas, RN muy prematuros de 28 a 32 semanas y RNP moderados 32 a 34 y RNP tardíos 34 a 37 semanas. ^{1,2,3}

Globalmente nacen 15 millones de RNP al año, representan 10 a 11% de todos los nacimientos. La incidencia de prematuridad se relaciona con el nivel de desarrollo de cada país, en Europa es del 6.2%, en Norte América 10.6% y en países económicamente emergentes, la incidencia de nacimientos pretérmino se eleva considerablemente; fluctúa entre 15 y 24%. La prematuridad es la principal causa de mortalidad neonatal y la segunda de mortalidad infantil. ⁴

Gracias a los grandes avances humanos y tecnológicos en los cuidados intensivos neonatales en los últimos años, cada vez sobreviven más RNP, los neonatólogos en todo el mundo encaran cotidianamente un reto terapéutico mayor debido a la elevada incidencia en morbilidad que resulta en estancias hospitalarias prolongadas, reingresos frecuentes, alteraciones en el neurodesarrollo, además de incremento en costos de atención y desestabilización en el núcleo familiar. ⁵

Paralelamente al incremento en la supervivencia de los RNP, se ha incrementado la incidencia de complicaciones, las más frecuentes asociado a patologías respiratorias que representan la morbilidad más frecuente en este grupo de pacientes, como el síndrome de dificultad respiratoria (SDR), la apnea de la prematuridad y la displasia broncopulmonar (DBP), como consecuencia cronológica de la aparición. ⁶

Se ha documentado que en el tercer trimestre de la gestación, los movimientos respiratorios fetales se limitan al sueño de movimientos oculares rápidos (REM por sus siglas en inglés: *rapid eye movement*), y cesan durante el sueño no REM, debido a que predominan las vías inhibitorias descendentes del centro generador del ritmo respiratorio medular, pero una vez superada la transición fetal a neonatal y en condiciones fisiológicas el patrón respiratorio postnatal se torna rítmico, constante y dependiente de la interacción y balance neuromuscular. ^{7,8}

Los RNP cursan con inmadurez neurológica central, debilidad de la musculatura respiratoria, ineficacia de la adaptación respiratoria postnatal tras la supresión de la oxigenación trasplacentaria; aunado a un pulmón con escaso desarrollo alveolar, déficit de síntesis de surfactante, aumento del grosor de la membrana alveolocapilar, desarrollo incompleto de la capa muscular arteriolar, disminución de la densidad capilar, así como hiposensibilidad de quimiorreceptores que en conjunto incrementan el riesgo para desarrollar problemas respiratorios. ^{2,4}

La apnea de la prematuridad, es un trastorno del desarrollo que refleja inmadurez del sistema nervioso central, específicamente del grupo de neuronas situadas en la medula oblongata que conforman los grupos respiratorios ventral y dorsal, es atribuido a la disminución en el número de sinapsis, arborización de las dendritas y a la mielinización incompleta, así como inmadurez de la función y respuesta de los quimiorreceptores. ⁹

La incidencia de la apnea de la prematuridad es inversamente proporcional a la edad gestacional (EG) del neonato, se ha informado que el 54% de los RNP de 30 a 31 SDG presentan episodios de apnea, el 77% de ellos inician en los primeros dos días de edad postnatal. En los RNP de 32 a 33 SDG se presenta en el 15%, y disminuye a 7% en los RNP de 34 a 35 SDG; sin embargo, en los RNP ≤ 28 SDG y/o ≤ 1000 g de peso, más del 90% presentan episodios de apnea que incrementan el riesgo de daño neurológico en esta vulnerable población. ^{10,11}

La apnea de la prematuridad se clasifica en: central, obstructiva y mixta¹² cuanto más frecuentes y profundos son los eventos de apnea en el RNP, mayor será la exposición a hipoxia crónica intermitente.¹³

El abordaje terapéutico de la apnea de la prematuridad comprende la ventilación no invasiva como la presión positiva continua a las vías aéreas (CPAP por sus siglas en inglés) y la ventilación con presión positiva intermitente nasal (NIPPV por sus siglas en inglés), la posición en decúbito prono y el tratamiento farmacológico con cafeína, los cuales han demostrado de acuerdo a la mejor evidencia científica disponible; eficacia en el control de las apneas. ¹⁴

La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina), es un alcaloide natural que se encuentra en los granos de café, en las hojas de té, en los granos de cacao y en muchas otras plantas, así mismo puede producirse sintéticamente. En forma general la cafeína es la sustancia farmacológicamente activa más frecuentemente ingerida en el mundo. ¹⁵

El descubrimiento del café tuvo lugar en el siglo V, por los pastores yemenitas quienes observaron que las cabras, que comían los frutos del cafeto eran más ágiles e inquietas, se cultivó por primera vez en

Etiopía, en el siglo XV se desarrolló la técnica de tostar y moler los granos de café y el consumo de los productos con cafeína se expandió rápidamente por todo el mundo. Friedrich Ferdinand Runge, aisló la cafeína del café en 1819 y del té en 1827, pero su estructura química no se describió hasta 1875 por E. Fischer, en el siglo XIX Sufis, fue el primero en utilizar cafeína por sus efectos farmacológicos.¹⁶

La cafeína y otros alcaloides metilxantínicos, como la teobromina (3,7- dimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina), son derivados del grupo de las xantinas, por su semejanza a las purinas, y actúa como antagonista selectivo del receptor A_{2a} de la adenosina y como antagonista no selectivo del receptor A_1 , su acción es modulada por neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamina y ácido gama amino butírico (GABA), incrementa el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), incrementa la quimio sensibilidad al CO_2 , la contractilidad diafragmática, produce broncodilatación, por tanto, previene y disminuye los episodios de apnea del prematuro, los días bajo soporte ventilatorio y la falla en la extubación; así mismo reduce la incidencia de displasia broncopulmonar, retinopatía del prematuro y requerimientos de cierre quirúrgico de conducto arterioso; sin embargo se asocia a incremento en el metabolismo y consumo de oxígeno y reduce el flujo sanguíneo cerebral y mesentérico.^{16,17,18}

De acuerdo a la farmacocinética de la cafeína se absorbe rápida y completamente en el tracto intestinal, posee biodisponibilidad del 100%, alcanza la máxima concentración plasmática entre 30 a 45 minutos posterior a su administración. Tiene un volumen de distribución de 0.6-0.7 L/kg, atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria.¹⁹

La cafeína presenta una cinética de eliminación del tipo Michaelis-Menten, resulta en una farmacocinética no lineal a dosis altas por saturación enzimática. La isoenzima del citocromo P-450 (CYP) hepático, subfamilia 1_A , gen 2 (CYP1A2) metaboliza por desmetilación la mayor parte de la cafeína (95%), transformándola en paraxantina (85%), teobromina (10%) y teofilina (5%). Posteriormente se metaboliza también por la CYP1A2 en monoxantinas, que serán sustrato de la xantinaoxidasas. Intervienen de forma minoritaria otras enzimas como la CYP2E1, y CYP3A3. Se han descrito hasta 25 metabolitos. Sólo entre un 1-2% de la dosis ingerida de cafeína se excreta sin cambios en orina. En los RNP, tanto el metabolismo como la tasa de depuración de cafeína están disminuidos, la vida media es de 72-96 h, puede administrarse vía oral o intravenosa,¹⁹ y la dosis estándar recomendada es 20 mg/Kg para impregnación y 5 mg/Kg dosis de mantenimiento cada 24 h, en caso de respuesta clínica insuficiente, se ha recomendado dosis de re-impregnación de 10 a 20 mg/Kg.²⁰

La cafeína tiene efectos sistémicos, a nivel cardiovascular provoca aumento de la presión arterial, efecto cronotrópico e inotrópico positivo por inhibición de los receptores adenosínicos cardiacos, resultando arritmias, taquicardia y extrasístoles. A nivel neuromuscular mejora el rendimiento físico porque produce vasodilatación a nivel muscular, aumenta la respuesta contráctil al estímulo nervioso. En el sistema gastrointestinal puede producir náusea, vómito irritación gástrica, enterocolitis necrosante, sangrado de tubo digestivo, estimula las contracciones de la vesícula biliar, relaja la musculatura lisa de las vías biliares, estimula la secreción ácida gástrica además genera aumento dosis-dependiente del colesterol total, HDL, LDL y de los triglicéridos, aunque parece que este incremento no es clínicamente relevante. Existen resultados contradictorios del efecto que produce la cafeína sobre la sensibilidad a la insulina, se presentan hipoglucemias e hiperglucemias. A nivel renal tiene un efecto diurético con tolerancia a largo plazo.¹⁸

Existe preocupación acerca del impacto negativo que las dosis diarias de cafeína podrían ocasionar en el desarrollo del sistema nervioso central del RNP. La cafeína inhibe los receptores de adenosina y se ha demostrado que, esta sustancia protege al cerebro de la falla energética y de la muerte celular o apoptosis ocasionadas por ejemplo por episodios hipóxico - isquémicos, desafortunadamente se desconocen los efectos a largo plazo de los RNP tratados con cafeína.^{17,18}

La ontogénesis perinatal del sistema nervioso se caracteriza por intensa diferenciación celular y formación de receptores, depende de procesos claves como la proliferación, diferenciación y migración neuronal. Las estructuras y células nerviosas derivan del ectodermo, la notocorda induce la formación de la placa neural, posteriormente la placa neural se convierte en surco y tubo neural. Una vez que el tubo neural está formado, las células neuro-epiteliales, futuras neuronas y células de glía, en la zona subventricular, migran masivamente para constituir la corteza cerebral. Finalmente, una vez que las neuronas alcanzan su posición definitiva, requieren cancelar el programa migratorio y continuar su diferenciación hasta alcanzar las características morfológicas y funcionales que les corresponden.²¹

Los RNP presentan inmadurez del sistema nervioso, si bien la neurogénesis cortical y la migración se han completado, la ramificación axonal y dendrítica continúan, y la sinaptogénesis apenas comienza. Cuando el RNP alcanza la EG correspondiente al termino; la sustancia blanca ha incrementado cinco veces y la gris cuatro veces, el plegamiento cortical comienza y esencialmente termina.²²

La vulnerabilidad neurológica del RNP puede incrementarse por malnutrición, infección, múltiples factores ambientales, tóxicos o fármacos como la cafeína que si bien ha demostrado beneficios inmediatos como el cese de episodios de apnea y mediatos como la disminución de la incidencia de DBP y retinopatía severa, persiste preocupación por sus efectos que podrían alterar procesos

neuroquímicos en el cerebelo en desarrollo, atribuido a la inhibición de los receptores de la adenosina y a los cambios en el flujo sanguíneo cerebral ²³, además estudios electrofisiológicos han demostrado que el hipocampo es particularmente sensible a los efectos inhibitorios de la adenosina y se ha documentado que el receptor A₁ ejerce neuroprotección por reducir la liberación de neurotransmisoras excitatorias y la cafeína lo antagoniza. ^{21, 33}

El daño o lesión cerebral es una complicación frecuente en el RNP, ocasiona secuelas neuromotoras, cognitivas y de conducta irreversibles, hasta hace poco la mayor parte de las investigaciones relacionadas se dirigían al cerebro, particularmente a daño de la sustancia blanca infartos y hemorragias supratentoriales, sin embargo, recientemente se ha encontrado evidencia que el daño cerebelar se asocia a profundas secuelas en el neurodesarrollo. ²¹

Tradicionalmente el cerebelo se ha considerado estructura primaria motora, encargada de la coordinación y control de movimientos, sin embargo en la última década se ha reconocido que el cerebelo desempeña tareas fundamentales de alto orden: modula importantes circuitos corticales cerebro-cerebelares, funciones cognitivas, motoras, socio-afectivas; grandes avances en neuroimagen, neuropatología y neurogenética han ampliado el conocimiento acerca de la estructura en bloques celulares del cerebelo, funciones precisas, procesos trans-sinápticos, así como el origen de lesiones tanto del desarrollo como adquiridas. ²¹

La embriogénesis e histogénesis del cerebelo es un proceso muy complejo programado y determinado por un gran número de genes y comprende cuatro pasos básicos: caracterización celular, formación de dos compartimentos por la proliferación de células de Purkinje y células granulosas, migración hacia el interior de células granulosas y diferenciación de neuronas del cerebelo. La ocurrencia de daño en el vulnerable e inmaduro cerebelo del RNP puede tener serias implicaciones neurocognitivas en el futuro. ²²

El cerebelo se desarrolla en un largo periodo que inicia a la cuarta semana de gestación y se extiende hasta 20 meses de edad postnatal, sin embargo el mayor desarrollo del cerebelo, diferente a otras estructuras cerebrales que se desarrollan en etapas tempranas de la gestación, ocurre en el tercer trimestre de la gestación, el volumen cerebelar incrementa 3.5 veces de las 28 a 40 semanas de gestación y 30 veces en su área de superficie; debido a la expansión de la capa de células granulosas en la corteza cerebelar, dicha expansión es mediada por las células de Purkinje a través de la proteína *Sonic Hedgehog*. Este periodo crítico de desarrollo, es complejo, programado, preciso y vulnerable a insultos potenciales capaces de interrumpir el correcto curso de dicho desarrollo y ocasionar daño profundo en el neurodesarrollo. ²⁵

Las células primarias cerebelares, son las células de Purkinje y sus núcleos, (dentado, emboliforme y globoso), inician su desarrollo en la edad gestacional temprana y las células granulosas aparecen poco después y representan a las células más numerosas en el sistema nervioso y las más vulnerables en el tercer trimestre de la gestación, especialmente a potenciales agentes dañinos, tales como episodios hipóxicos, toxinas, fármacos y factores ambientales. Otras poblaciones celulares cerebelares, como las células estrelladas o células en canasta, también pueden ser afectadas y perder su capacidad de intercomunicación celular y conexiones recíprocas entre cerebro y cerebelo debido a lesiones cerebelares primarias. La mielinización cerebelar ocurre en dirección caudal a craneal a las 30 a 31 SDG, al término de la gestación el núcleo dentado está completamente mielinizado y después del nacimiento ocurre rápida mielinización que incluye a los pedúnculos cerebelares medios.²⁵

La proliferación y migración de las células granulosas es un periodo crítico en el cual se establecen patrones de conectividad neural, a las 20 SDG se extienden axones desde el núcleo olivar del cerebelo y a las 34 SDG ascienden dendritas de las células de Purkinje, en un proceso que continúa hasta la EP. Se ha informado que eventos hipóxico - isquémicos perinatales y la administración de corticoesteroides postnatales, reducen la proliferación de células granulosas, favorecen apoptosis y disminución del número de células de Purkinje, situación que daña la formación de la capa de células granulosas y por tanto las futuras conexiones corticales.²⁶

Los modelos animales son fundamentales en la investigación biomédica o preclínica. El ratón y la rata son los modelos experimentales más utilizados en el campo de la investigación básica mundial, debido a que el 99 % de sus genes; poseen contraparte humana, son relativamente económicos de criar, mantener, se pueden reproducir rápidamente y no tienen variabilidad genética. Su fisiología y genética han sido estudiadas en profundidad, y pueden ser comparados con humanos fácilmente. Las crías de rata Wistar nacen normalmente a finales de la fase sacular pulmonar y en pleno proceso de desarrollo del sistema nervioso central. Existen varias cepas. En las ratas las 2 cepas más utilizadas son Sprague-Dawley y Wistar. La rata Wistar es un mamífero albino híbrido, fue la primera cepa de rata desarrollada para emplear como modelo animal en múltiples experimentos, tiene un ciclo reproductor poliéstrico continuo de 4-5 días. Alcanza la pubertad a los 70-80 días de vida, con un peso de 200 a 250g, y mantiene una capacidad de concebir 18-20 veces. La duración de la gestación es de 21-22 días, con camadas de 7-14 crías por parto. Generalmente es muy buena madre, al nacimiento está muy pendiente de sus crías, las lame para retirar membranas placentarias, estimular su respiración y otros reflejos (micción y defecación), sin embargo uno de los principales problemas es el canibalismo de madres jóvenes de colonias de reciente creación hacia sus crías, la conducta maternal de la hembra es provocada por cambios hormonales (estrógeno, progesterona, oxitocina y prolactina) y

factores ambientales pueden alterar o inhibir esta conducta por lo que no es típico de la madre matar a sus crías.^{27,28,29} Las crías de esta rata a su nacimiento al día 21 a 22 de la gestación cumplen con características anatómicas y fisiológicas que semejan a un RNP de 32-33 SDG, por lo que la convierte en un modelo ideal, para el presente y otros trabajos de investigación.

5.- Antecedentes

En la literatura se han reportado distintos estudios con cafeína, el principal es el "CAP" (*caffeine for apnea of prematurity*, por sus siglas en inglés) ensayo clínico controlado y aleatorizado en el que incluyeron 2006 RNP con peso al nacer entre 500 y 1,250 g, asignados al azar para recibir cafeína o placebo en los primeros 10 días de vida, encontraron que de los 963 sobrevivientes del grupo cafeína, el 36% desarrolló DBP, contra el 47% en el grupo placebo ($p < 0.001$), (OR: 0.63, IC 95%: 0.52-0.76). Además, el soporte ventilatorio fue discontinuado más tempranamente en el grupo de cafeína que en el grupo placebo ($p < 0.001$), con lo cual recientemente se ha propuesto su administración temprana o en forma profiláctica.³⁰

En el seguimiento de este estudio (CAP) se informó mejor evolución neurocognitiva en el seguimiento a 18 y 21 meses de los pacientes que recibieron cafeína en contraste con los que recibieron placebo, fue menor la incidencia de parálisis cerebral (4.4% grupo cafeína *versus* 7.3% grupo placebo) y concluyeron que la cafeína mejora sobrevivida sin alteraciones en el neurodesarrollo,³¹ sin embargo continuaron el seguimiento de la misma cohorte y se reportó tanto a los 18 meses como a los 5 años de edad el grupo cafeína no mantuvo la asociación a mejor evolución neurocognitiva.³² El último estudio de seguimiento publicado en 2017, se evaluaron a los pacientes en edad escolar, a los once años después de la administración de cafeína y del placebo, concluye que no encontraron disminución significativa en el rango académico, en actividades motoras o alteraciones en el comportamiento, pero si fue asociado a disminución del riesgo de alteraciones motoras, que atribuyen en parte a que el grupo cafeína requirió menor tiempo de ventilación mecánica y menor presión media de vías aéreas, los cuales son predictores de pobre pronóstico neurológico.³³

En una revisión sistemática sobre el uso temprano de cafeína en recién nacidos de bajo peso, se comparó el uso de cafeína temprana en los primeros 2 días *versus* el inicio tardío de cafeína después de los 3 días de vida, se contrastaron 5 estudios que reunieron 59,136 pacientes encontraron para la variable muerte: OR 0.902; 95% (IC 0.828-0.98; $P = 0.019$) a favor de cafeína (3.8% *versus* 4.2%), y para displasia broncopulmonar; OR 0.507; 95% (IC 0.396 - 0.648; $P < 0.001$) (20.0% *versus* 34.6%) a favor del inicio temprano de cafeína.³⁴

En relación a la cafeína se ha reportado que los receptores de adenosina propagan neuroinflamación, y la cafeína actúa como protector al regular la liberación de glutamato y atenúa la microglía activada y la diferenciación del precursor de oligodendrocitos en el hipocampo en algunos modelos animales,^{34, 35} además posee efectos inmunomoduladores; disminuye la liberación del factor de necrosis tumoral alfa

(TNF- α) y de la interleucina-10 (IL-10), mediante diferentes mecanismos. En concreto la comprensión de los distintos efectos moduladores de las citocinas, resulta relevante en el contexto del desarrollo de la displasia broncopulmonar y otras morbilidades relacionadas con inflamación en los RNP.^{36,37}

Estudios postmortem revelan elevada incidencia de pérdida neuronal y/o gliosis en el núcleo olivar y dentado de pacientes con hemorragia cerebelar en contraste con controles sin hemorragia cerebelar, se ha reportado necrosis del núcleo dentado el cual se encuentra entre los hemisferios cerebelares y desempeña funciones neurológicas fundamentales.²⁶ McPherson y su grupo realizaron un ensayo clínico en el cual administraron cafeína en las primeras 24 h de edad postnatal a RNP < 30 SDG, al azar recibieron dosis de impregnación estándar (20 mg/Kg) o dosis alta 80 mg/Kg y encontraron que en el grupo de RNP que recibieron dosis alta de cafeína (80 mg/Kg) presentaron mayor incidencia de hemorragia cerebelar (36 *versus* 10%, $p=0.02$), así como mayores manifestaciones de daño neurológico, particularmente motoras.³⁸

6.- Planteamiento del problema

La cafeína es uno de los fármacos más utilizados en las unidades de cuidados intensivos neonatales en todo el mundo, es el estándar de oro farmacológico para la apnea de la prematuridad, recientemente se ha recomendado la administración temprana o profiláctica sustentado en la disminución de la incidencia de DBP y menor tiempo de requerimiento ventilatorio, sin embargo, existe controversia en la seguridad del fármaco sobre su inicio en las primeras horas de edad postnatal, las dosis utilizadas y su duración, particularmente debido a que se desconocen los efectos de la cafeína en el desarrollo cerebelar en el RNP, que además se encuentra desde su nacimiento expuesto a FiO₂ variable. Es por ello que se plantea la siguiente pregunta de Investigación:

¿Cuál es el efecto de la administración temprana de cafeína sobre el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico?

7.- Justificación

La sobrevivencia de los RNP se ha incrementado gracias a los avances médicos, tecnológicos e infraestructura en los últimos años. Cada vez nos enfrentamos a recién nacidos de menor EG y menor peso corporal los cuales presentan elevada morbilidad. La interrupción del desarrollo pulmonar y cerebral debido al nacimiento pretérmino representa uno de los principales problemas que encaran los RNP. Una de las entidades patológicas relacionadas con la inmadurez es la apnea de la prematuridad; cuya incidencia es inversamente proporcional a la EG. La cafeína pertenece al grupo de las metilxantinas y se ha utilizado universalmente en los últimos 40 años para el tratamiento de esta patología y mediante ensayos clínicos controlados y aleatorizados se ha demostrado que disminuye los episodios de apnea, los días bajo soporte ventilatorio y la falla en la extubación; así mismo reduce la incidencia de displasia broncopulmonar, retinopatía del prematuro y requerimientos de cierre quirúrgico de conducto arterioso; sin embargo existe preocupación por los efectos adversos en el desarrollo neurológico, en especial del cerebelo de esta vulnerable población.

Se estima que en el mundo nacen alrededor de 15 millones de RNP, más de un millón de ellos mueren cada año, y muchos de los que sobreviven presentan alteraciones neurocognitivas. Los neonatólogos en todo el mundo enfrentan cotidianamente un reto terapéutico mayor; no sólo porque en la última década se ha incrementado la sobrevivencia de los RNP, sino también por su elevada morbilidad que resulta en estancias hospitalarias prolongadas, reingresos frecuentes, dificultades en la ganancia ponderal y alteraciones en el neurodesarrollo, consecuentemente incremento significativo en los costos de la atención.

8.- Hipótesis

Hipótesis alterna:

La administración temprana de cafeína en los primeros 15 días de edad postnatal; en crías de rata Wistar altera el desarrollo de la corteza del cerebelo, reduce el número y altera las características de las células de Purkinje, además disminuye la migración celular.

Hipótesis nula:

La administración temprana de cafeína no altera el desarrollo de la corteza del cerebelo, no reduce el número y no altera las características de las células de Purkinje y no produce disminución en la migración.

9.- Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la administración temprana de cafeína en el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental.

Objetivos específicos:

- a) Cuantificar el grosor de la capa granular externa (CGE) en los diferentes grupos de estudio.
- b) Cuantificar el grosor de la capa molecular (CM) en los diferentes grupos de estudio.
- c) Cuantificar células en migración de la CGE en los diferentes grupos de estudio
- d) Determinar las características de la citoarquitectura de la corteza cerebelosa a los 15 días postnatales de los diferentes grupos de estudio (células de Purkinje)
- e) Determinar la relación del peso de las crías y la intervención farmacológica entre los diferentes grupos de estudio.

10.- Material y métodos

Diseño de estudio: Experimental, aleatorizado y cegado.

Lugar donde se realizó el proyecto: En el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco, México.

Universo de estudio: 24 crías recién nacidas de la cepa Wistar, todos los animales empleados en este estudio fueron proporcionados por el laboratorio de crianza y reproducción de animales para experimentación del bioterio del CIBO, IMSS.

Criterios

Criterios de inclusión: Fueron incluidas al estudio las crías de rata Wistar sanas.

Criterios de exclusión: Fueron excluidas para el análisis del estudio las crías que murieron durante el experimento.

Cálculo muestral:

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró el número de repeticiones necesarias en una probabilidad dada, para obtener un resultado significativo en estudios experimentales,⁴¹ en este tipo de estudios no es necesario realizar cálculo de tamaño de muestra, ya que éste fue establecido con base en la homogeneidad genética de las cepas utilizadas, así como en los lineamientos para el desarrollo del modelo o roedores, esto fue asentado por Hayashi y colaboradores en el año 2000, de manera consensuada, se estableció que se deben tener al menos 5 miembros por grupo de trabajo y de éstos contar con al menos 4 muestras analizables por grupo; dichos lineamientos fueron respetados en el presente estudio.⁴²

Descripción general del estudio:

Se realizó un estudio experimental, aleatorizado y cegado, con modelo experimental (crías de rata Wistar) los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de crianza y reproducción de animales para experimentación. Se aparearon 5 ratas hembras Wistar, se verificó todos los días siguientes al apareamiento mediante un lavado vaginal la presencia de espermatozoides, y al ser positivo se contó como primer día de la gestación. Las ratas gestantes se alojaron en jaulas de policarbonato de manera individual y mantenidos en condiciones de bioterio con acceso a alimento especial (Purina®) y agua *ad libitum*, hasta el día 21 - 22 de gestación en que sucedió el nacimiento. Se integraron 3 grupos de estudio al azar, con 8 crías cada uno:

1. **Control negativo:** sin recibir ninguna intervención.
2. **Grupo intervención cafeína:** Se asignaron 8 crías a las cuáles se les administró cafeína vía oral desde el día 1 de EP inicialmente dosis de impregnación a razón de 20 mg/Kg y a partir del día 2 al 14 de EP a 5 mg/Kg como dosis de mantenimiento.
3. **Grupo intervención cafeína + oxígeno:** Se asignaron 8 crías, a las cuales se les garantizó su nacimiento en ambiente hiperóxico con FiO_2 al 0.80%, para lo cual la rata gestante se colocó en la cámara hiperóxica a partir del día 21 de gestación debido a que el parto sucede en el día 21-22 de gestación y se mantuvieron en ambiente hiperóxico hasta el día 7 de EP, para emular al recién nacido pretérmino humano. Además se les administró cafeína desde el día 1 de EP, inicialmente dosis de impregnación a razón de 20 mg/Kg y a partir del día 2 al 14 de EP a 5 mg/Kg como dosis de mantenimiento.

Las crías fueron separadas y asignadas de acuerdo a su grupo, se mantuvieron en jaulas de policarbonato junto a la rata madre, se pesaron diario con una balanza Dhaus CS 200 ®. La cafeína administrada fue donada por Chiesi ®, se respetaron los lineamientos de ética en la investigación, ninguno de los investigadores tenemos conflicto de interés. (Se anexa constancia en anexos). Las dosis de cafeína fueron calculadas de acuerdo al peso corporal de la cría y la dosis requerida para impregnación o mantenimiento, fue administrada vía oral con una cánula oro-esofágica (Kent Scientific®) semiflexible, curva y roma diseñada especialmente para crías de rata.

Al llegar al día 15 de EP, las 24 crías de los 3 grupos fueron sacrificadas en el quirófano del CIBO, previa administración de xylacina intramuscular analgésico sedante y relajante muscular a razón de 5 microgramos por Kg⁴⁵, y posteriormente pentobarbital sódico intraperitoneal a razón de 25 mg/Kg⁴⁶. Una vez confirmada la eutanasia de las crías se obtuvo el peso corporal, y mediante disección con tijeras y hojas de bisturí se obtuvo el cerebro, bajo la supervisión y apoyo del MVZ David Zeferino García Martínez, el cerebro disecado se lavó para eliminar sangre y detritus celulares en búfer de fosfatos. Se fijaron por inmersión en solución de paraformaldehído al 3% y en amortiguador de fosfatos posteriormente fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 4 μ con micrótomo (American Optical ®), se montaron en portaobjetos codificados con lápiz de punta de diamante y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina, fueron observados en el fotomicroscopio (Axioskscope-Ziess ®) equipado con micrómetro óptico y analizador de imágenes (Image-pro ® Plus, Media Cybernetics), se tomaron microfotografías. Las evaluaciones fueron realizadas con técnica

interobservador por 3 médicos neuropatólogos quienes ignoraban a qué grupo pertenecían las laminillas mismas que fueron previamente codificadas con lápiz de punta de diamante. Se utilizaron aumentos 20 – 40X y se determinó en los 3 grupos de estudio:

- Grosor de la CGE.
- Grosor de la CM.
- Cuantificación de las células en migración de la CGE en una ventana de 600 μM cuadrados, en tres diferentes áreas que fueron promediadas.
- Características de la citoarquitectura de la corteza cerebelosa (células de Purkinje).
- Relación del peso de las crías y la intervención farmacológica.

El manejo de los animales y realización de las intervenciones experimentales tales como administración de medicamentos para sacrificio (xylacina y pentobarbital), disección del cerebro fueron supervisadas por el MVZ David Zeferino García; la disección del cerebelo fue realizada por el Dr. Genaro Gabriel Ortiz.

Variables

Las variables de este estudio fueron las siguientes:

Independientes:

- Cafeína
- Administración de oxígeno

Dependiente:

- Grosor de la CGE
- Grosor de la CM
- Células de Purkinje.
- Peso corporal
- Tiempo bajo ambiente enriquecido por oxígeno.

Cuadro1. Operalización de las variables

Variables independientes	Definición operacional	Unidad de medición	Escala	Estadística
Cafeína	Fármaco que inhibe los receptores de adenosina, por tanto estimula la respiración.	Frecuencia	Cualitativa Nominal	No aplica
Oxígeno	Elemento químico, que se administra como fracción inspirada de oxígeno.	Frecuencia	Cualitativa Nominal	No aplica
Variables dependientes	Definición operacional	Unidad de medición	Escala	Estadística
Grosor de la CGE	Constituida por células granulares, estructura fundamental de la corteza cerebelar.	Espesor μm	Cuantitativa continua	Media, Desviación estándar ANOVA PostHoc
Grosor de la CM	Presencia de células que forman la capa molecular.	Espesor/ μm	Cuantitativa continua	Media, Desviación estándar ANOVA PostHoc
Células de Purkinje	Célula neuronal bipolar que representa las unidades funcionales del cerebelo.	Frecuencia	Cualitativa Nominal	Media, Desviación estándar , t de Student
Peso corporal	Es la cantidad de materia de un cuerpo.	Gramos y miligramos	Cuantitativa continua	Media, Desviación estándar ANOVA PostHoc
Tiempo ambiente enriquecido por oxígeno	Periodo de tiempo medido en días en el cual se encontrarán sometidos a oxígeno.	Días	Cuantitativa discontinua	Media

Análisis estadístico:

Los datos cuantitativos se presentaron como medias \pm desviación estándar (DS). Las comparaciones de los grupos se realizaron por análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente una prueba posthoc entre los grupos. Utilizamos las pruebas de estadística inferencial, *t* de *Student* para datos paramétricos, Se consideró un valor con significancia estadística cuando la *p* resultó < 0.05 , con nivel de confianza de 95%.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS (*Statistical package for the social sciences*, por sus siglas en inglés) versión 22.

11.- Aspectos éticos

El experimento fue realizado de acuerdo a las Normas Institucionales y Gubernamentales para el uso y manejo ético de los animales de experimentación (NOM-062-ZOO-2001).⁴⁷ Todos los procedimientos fueron conducidos de acuerdo a los lineamientos institucionales del CIBO, IMSS, y acorde con aquellos aprobados por los Institutos de Salud Nacional e Internacional, basados en la Ley General de Salud y la NOM-008-SSA2-1993.^{43, 44} Al finalizar la fase experimental, los animales fueron entregados a los responsables del bioterio; las ratas adultas no fueron sacrificadas, se sometieron a periodo de lavado y de acuerdo a necesidades del bioterio podrían utilizarse en otros experimentos, las crías después de ser sacrificadas y posterior a la disección del cerebro, se entregaron en bolsas de papel de estraza y en bolsas amarillas para residuo biológico al personal responsable del bioterio quienes decidieron el destino final.

Todos los participantes de este proyecto declaramos que no tenemos **conflicto de interés**.

Bioseguridad:

Las ratas gestantes y sus crías se alojaron en jaulas de policarbonato de manera individual y mantenidas en condiciones de bioterio. En el presente proyecto NO se emplearon productos químicos o biológicos tóxicos o de riesgo, ni material infecto contagioso, ni radioactivo que ponga en riesgo al personal del bioterio, a los investigadores y en general personal del CIBO. Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales. Las instalaciones y el equipo de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y fue adecuado para la realización de este trabajo. Los involucrados en el proyecto, recibimos la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente. Se mantuvieron las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto.

12.-Recursos y financiamiento

El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones del CIBO IMSS, los recursos y la infraestructura necesaria para la realización del proyecto fueron brindados por el Departamento de Neurociencias.

Todos los animales del estudio fueron solicitados al bioterio del CIBO IMSS. El grupo de investigación participante cuenta con la experiencia necesaria para desarrollar todos los procedimientos metodológicos planteados.

Recursos humanos:

- Residente de 2° año de neonatología
- Medico director y asesores clínicos del proyecto
- Asesor metodológico
- Personal del laboratorio, Neurociencias del CIBO IMSS

Recursos físicos:

- Instalaciones de CIBO

Recursos materiales papelería:

- Lápices, Plumas
- Hojas (bitacora) de recolección de datos
- Hojas de papel blancas para impresión
- Computadora y programas de cómputo
- Impresora y tinta para impresión

Recursos materiales experimento:

- 5 ratas Wistar hembras y 24 crías
- Guantes
- Jeringas
- Jaula de polietileno
- Aserrín
- Alimento para ratas Purina ®
- Cámara hiperóxica
- Tomas de oxígeno, borboteador
- Balanza Dhaus CS 200 ®
- Cánula oro-esofágica Kent Scientific ®
- Oxímetro ambiental
- Cafeína Chiesi ®
- Xylacina
- Pentobarbital
- Portaobjetos
- Lápiz punta diamante
- Hojas de bisturí No5
- Gasas /hisopos
- Equipo de cirugía menor
- Paraformaldehído al 3%
- Amortiguador de fosfatos
- Parafina
- Hematoxilina y eosina
- Micrótopo (American Optical ®)
- Fotomicroscopio (Axioskscope-Ziess ®) equipado con micrómetro óptico y analizador de imágenes (Image-pro ® Plus, Media Cybernetics)

13.-Resultados

Se analizaron las laminillas de 24 crías recién nacidas de la cepa Wistar, con el fotomicroscopio (AxiosKscope-Ziess ®) equipado con micrómetro óptico y analizador de imágenes (Image-pro ® Plus, Media Cybernetics), de los tres grupos de estudio que se conformaron. Las medidas y desviaciones estándar registradas del espesor de la capa granular externa para el control negativo: $130\pm 15\mu\text{m}$; grupo cafeína sin oxígeno: $280\pm 20\mu\text{m}$ y grupo cafeína + oxígeno: $180\pm 18\mu\text{M}$, y de la capa molecular control negativo: $500\pm 20\mu\text{m}$; cafeína sin oxígeno: $280\pm 25\mu\text{m}$ y cafeína + oxígeno: $440\pm 22\mu\text{m}$ (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar del espesor de la capa granular externa y la capa molecular en los tres grupos. (n=24)

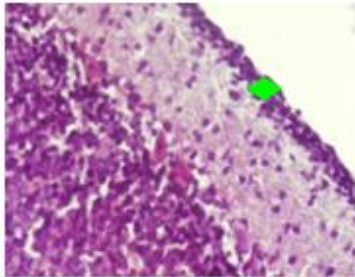
GRUPO	ESPESOR CGE	ESPESOR CM
Grupo 1: Control negativo	$130\pm 15\mu\text{m}$	$500\pm 20\mu\text{m}$
Grupo 2: Cafeína	$280\pm 20\mu\text{m}$	$280\pm 25\mu\text{m}$
Grupo 3: Cafeína + oxígeno	$180\pm 18\mu\text{M}$	$440\pm 22\mu\text{m}$
CGE: Capa Granular externa. CM: Capa Molecular P <0.001		

El espesor de la capa granular externa y capa molecular de los tres grupos de estudio se muestran en las microfotografías representativas de los tres grupos de estudio, que permite comparar las diferencias de espesor entre las capas y los grupos. (Figura 1.)

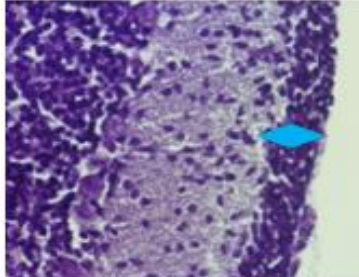
Figura 1.

Capa granulosa externa

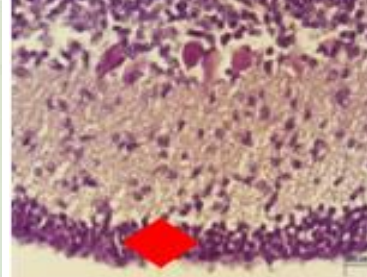
a) control negativo



b) grupo con cafeína

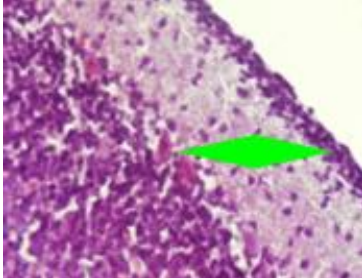


c) grupo con cafeína y oxígeno

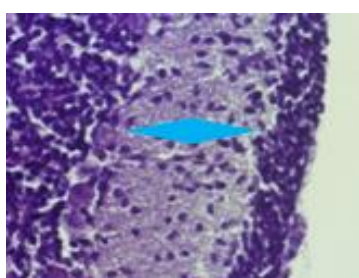


Capa molecular

a) control negativo



b) grupo con cafeína



c) grupo con cafeína y oxígeno

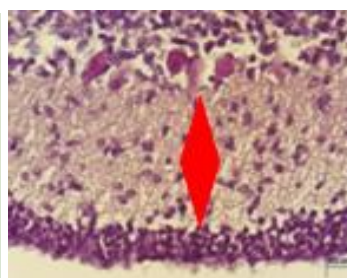
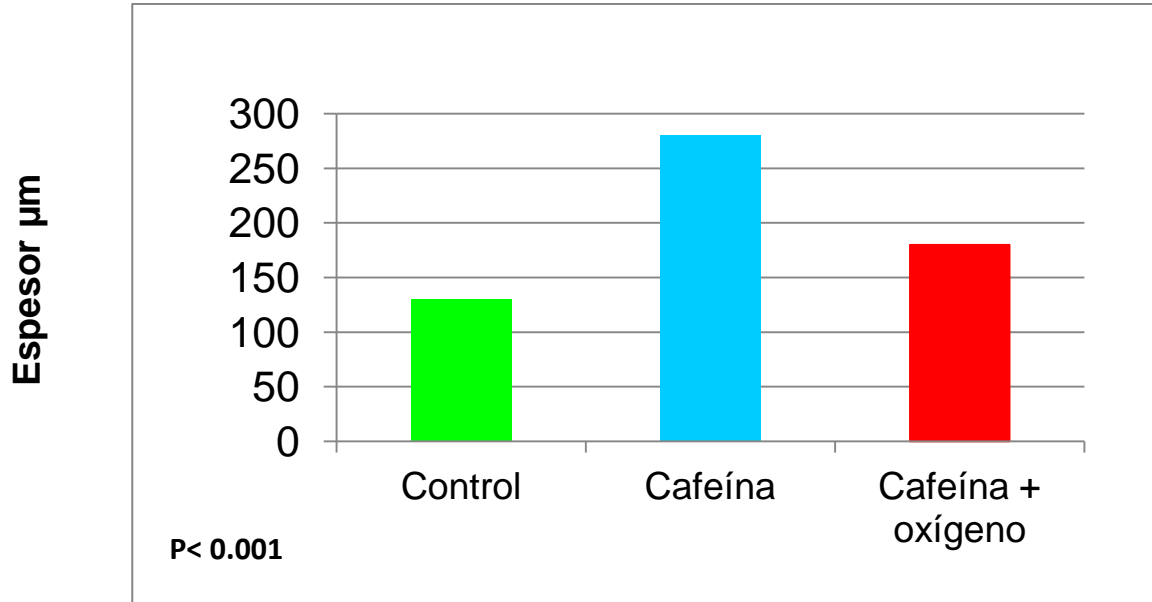


Figura 1.- Se muestra el espesor de las capas de la corteza cerebelar en los tres grupos de estudio.

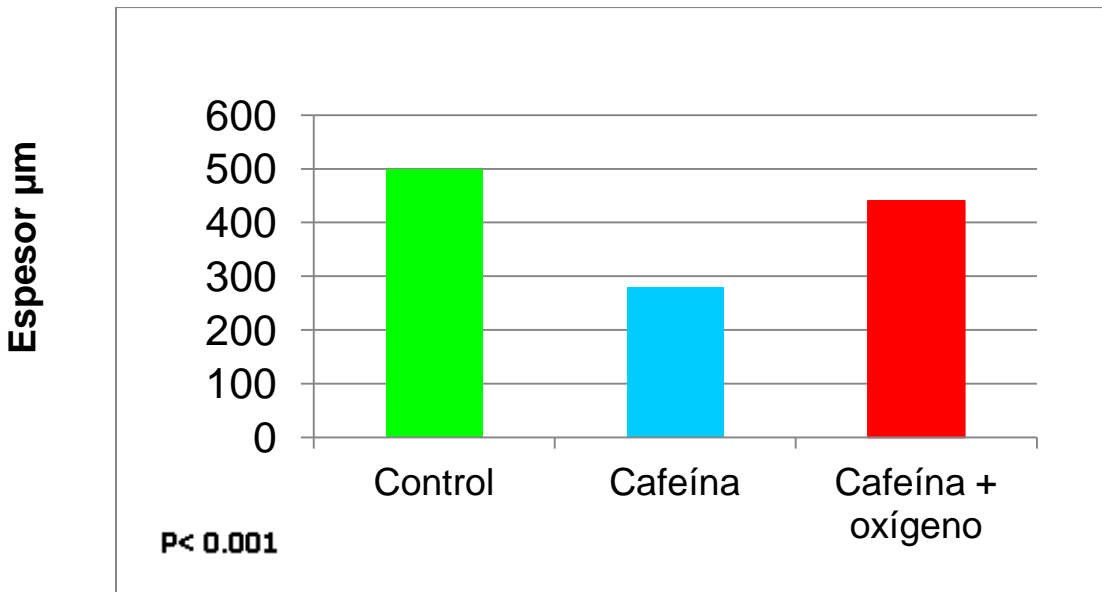
La gráfica 1 muestra en forma esquemática la diferencia significativa en el espesor en μm de la CGE entre los grupos de estudio con una $p < 0.001$, el grupo control aparece en color verde, el grupo cafeína en azul y en rojo el grupo cafeína + oxígeno. (Grafica 1.)

En relación a la capa molecular, igualmente se encontró diferencia significativa del grosor de la misma expresado en μm , entre los grupos de estudio con una $p < 0.001$, tal como se muestra en forma esquemática en la Grafica 2.

Gráfica 1. Espesor de la capa granular externa en los tres grupos (n=24)



Gráfica 2. Espesor de la capa molecular en los tres grupos (n=24)

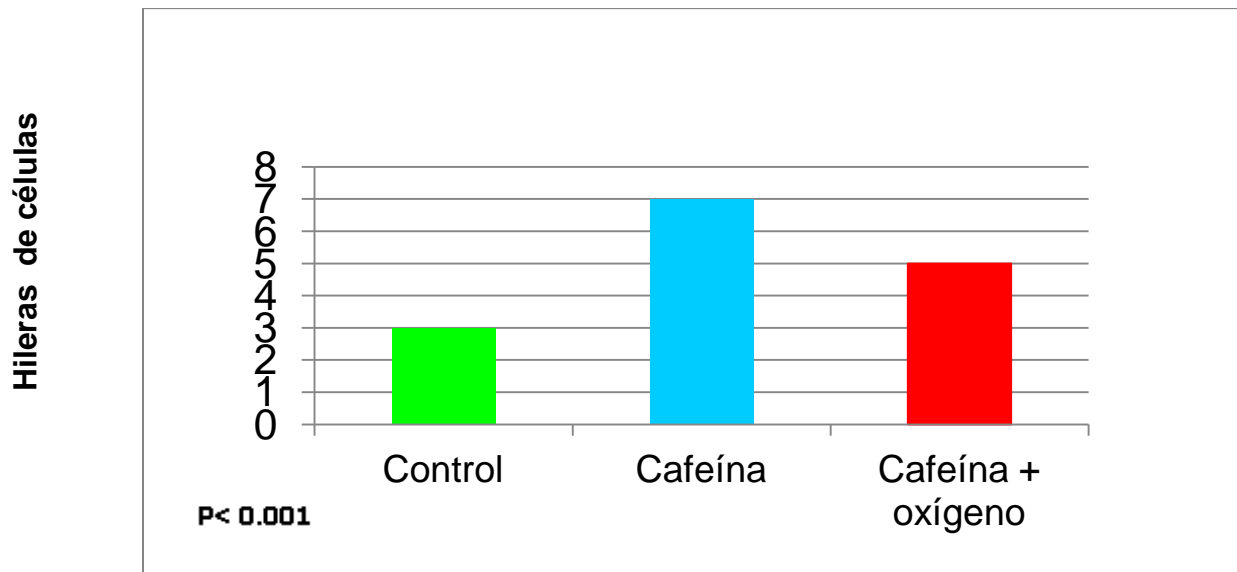


En relación al conteo y evaluación de las células, se revisaron tres ventanas de 600 μm^2 elegidas al azar y fueron promediadas. Se analizaron las células en migración de la CGE, se cuantificaron las hileras de células. (Cuadro 3.) Encontramos diferencia significativa entre los grupos de estudio, el grupo cafeína mostró 7-8 hileras de células y 83 ± 8 células en migración, en contraste con el grupo control quien presentó 3-4 hileras y 50 ± 5 células en migración, ($p < 0.001$) situación que denota interrupción en el desarrollo; así mismo el grupo cafeína más oxígeno presentó 5-6 hileras de células y consecuentemente 72 ± 5 que resulto significativo en contraste con el grupo control como se observa esquemáticamente en las gráficas 3 y 4.

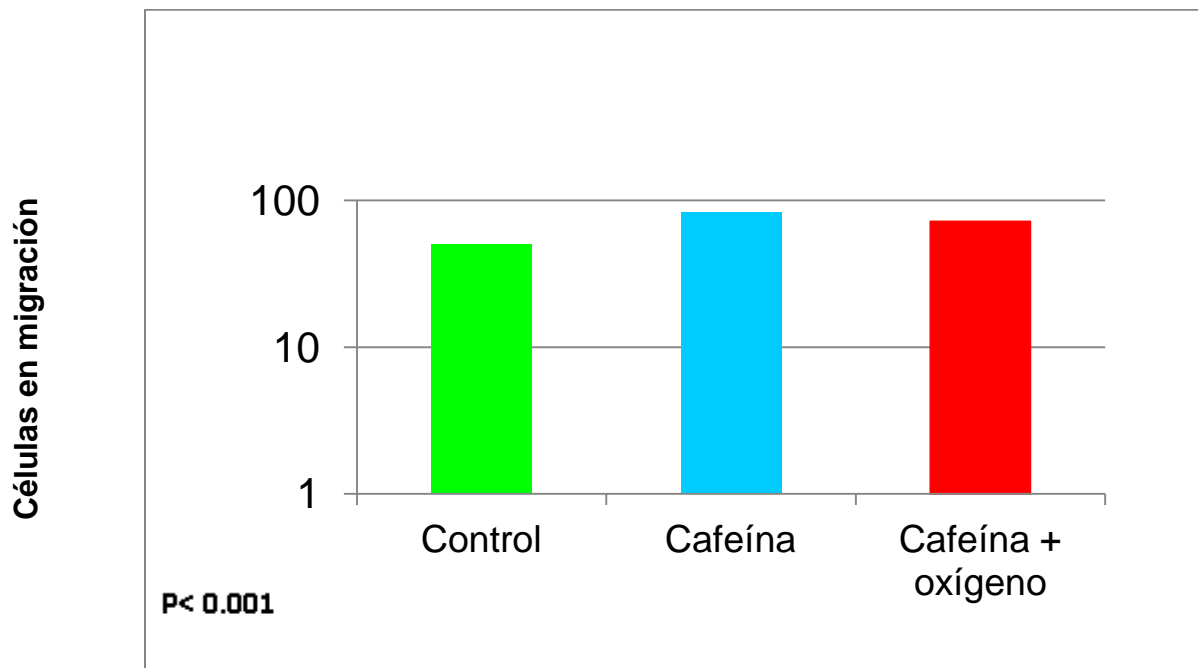
Cuadro3. Promedio y desviación estándar del número de células en migración en los tres grupos (n=24)

GRUPO	HILERAS DE CELULAS	CÉLULAS EN MIGRACIÓN
Grupo 1: Control negativo	3-4	50 ± 5
Grupo 2: Cafeína	7-8	83 ± 8
Grupo 3: Cafeína + oxígeno	5-6	72 ± 5
P <0.001		

Gráfica 3. Hileras de células de la capa granular externa en los tres grupos (n=24)



Gráfica 4. Células en migración de la capa granular externa en los tres grupos (n=24)



Los cambios más importantes en la citoarquitectura se encontraron en las células de Purkinje, con diferencia significativa en el grupo 3, cafeína + oxígeno en contraste con el control, encontramos alteraciones considerables, tales como: displasia, hipercromacia nuclear, gliosis periférica y necrosis celular, estos cambios reflejan degeneración celular, tal como observamos en la microfotografía representativa, claramente se observan núcleos hipercromáticos y en el centro muerte celular (Figura 2.) No encontramos diferencia significativa entre los grupos 1 y 2.

Figura 2. Células de Purkinje

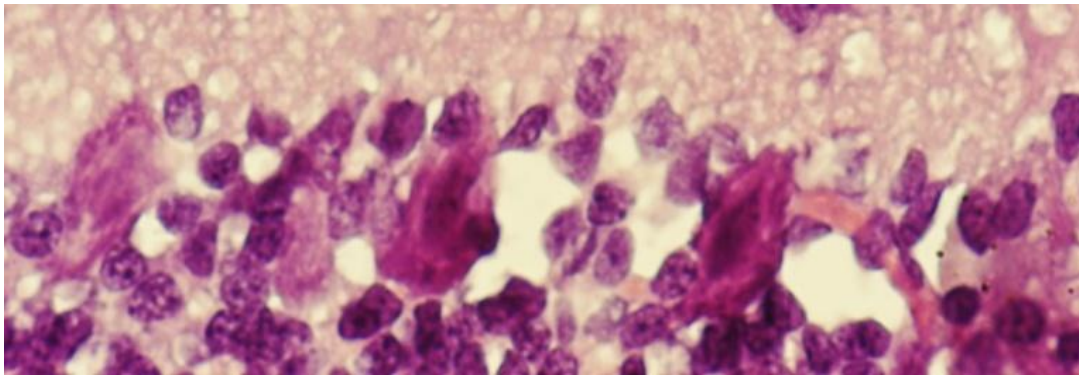
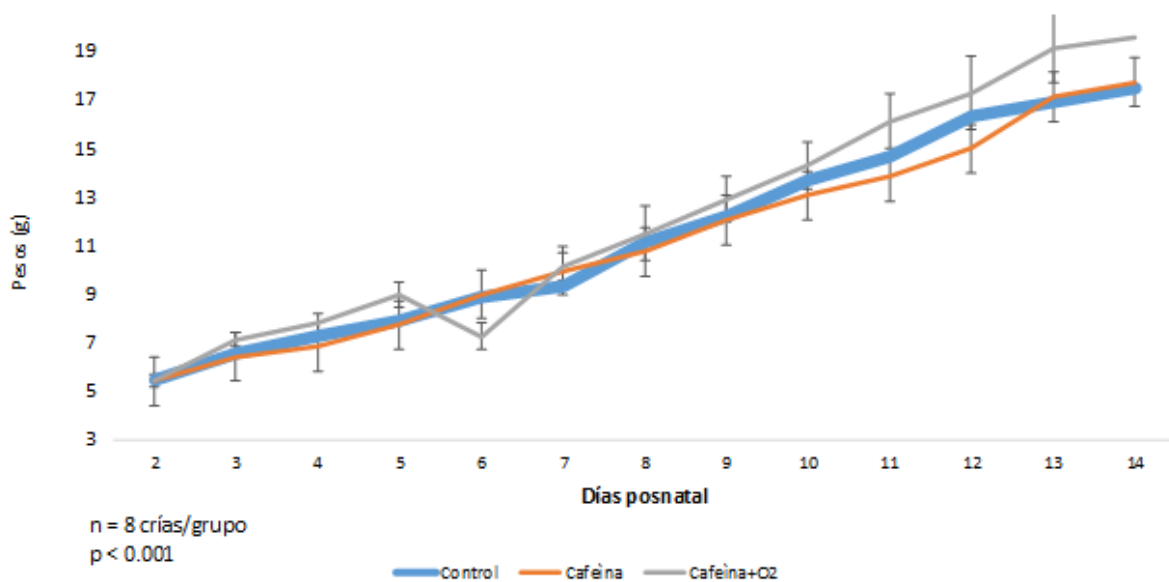


Figura 2.- Se muestra displasia, núcleos hipercromáticos y necrosis celular de las células de Purkinje. .

Respecto al seguimiento de los pesos de las crías durante los días de intervención; se obtuvo la media de cada grupo y su desviación estándar: grupo control 17.7 gr \pm 0.8, grupo cafeína 17.7 g \pm 0.8, y para el grupo cafeína + oxígeno 19.45 g \pm 1.3. Se compararon entre los grupos, y encontramos diferencia significativa entre el grupo cafeína + oxígeno en contraste con el control con una $p < 0.02$, tal como se muestra en la gráfica lineal. (Gráfica 5.)

Gráfica 5. Evolución del peso de las crías durante las intervenciones (n=24)



14.-Discusión

Los resultados encontrados fueron muy interesantes, se analizaron 24 cerebros de crías de rata Wistar distribuidos al azar en 3 grupos de acuerdo a su intervención. El análisis histopatológico de las capas que componen la corteza cerebelosa, así como las características o citoarquitectura de las células que la conforman, fue realizado con técnica interobservador y se obtuvo kappa de 0.9.

Respecto al grosor de la CGE y la CM de los 3 grupos, encontramos diferencia con significancia estadística ($p < 0.001$); fundamentada en los cambios de espesor expresada en μm , entre las capas de los grupos cafeína y cafeína + oxígeno en contraste con el grupo control, tal como se observa en el cuadro 2 y en las gráficas 1 y 2, así mismo se muestran microfotografías representativas de la CGE y de la CM de los tres grupos, marcadas con el color correspondiente a cada grupo de acuerdo a las gráficas de barras: verde para el grupo control, azul para el grupo cafeína y rojo para el grupo cafeína + oxígeno. Ambos grupos fueron expuestos tempranamente a dicha metilxantina a dosis estándar y por el mismo periodo de tiempo, encontramos la CGE con un mayor espesor en los grupos con la intervención respecto al control. La CM presentó mayor espesor en el grupo control, respecto a los de intervención. (Cuadro 2, figura1, gráfica 1). Las células granulosas son las células más abundantes en el periodo de desarrollo cerebelar y cursan con gran actividad de migración, situación que les confiere extrema vulnerabilidad a diferentes cambios ambientales, como fármacos, productos tóxicos o drogas y episodios de hipoxia.²⁴ Estos cambios de espesor que sufren las capas de la corteza cerebelar son inversamente proporcionales al proceso de migración y denotan interrupción o demora en el desarrollo y consecuentemente inmadurez.

El desarrollo cerebelar normal del RNP inicia en fases muy tempranas de la gestación, desde la semana 12 es posible delimitar los hemisferios cerebelares y el vermis,^{25,47} las células que conforman la corteza cursan por diferentes procesos de diferenciación, proliferación y migración perfectamente "orquestados" durante la gestación, hasta conformar la corteza cerebelar madura. La capa molecular, contiene células estrelladas y en cesta, además de las dendritas de las células de Purkinje y de Golgi tipo II, axones de células granulares conocidas como fibras paralelas y proyecciones de la glía de Bergmann; La capa intermedia con cuerpos neuronales de las células de Purkinje, y la capa granular, la capa más interna contiene

numerosas células granulares, Golgi II y glomérulos complejos, nódulos sinápticos con axones de fibras musgosas, axones de dendritas, de células de Golgi y dendritas de células granulares.²⁵ Para lograr esta conformación de capas y conexiones complejas; el cerebelo debe cursar la fase más crítica e importante de su desarrollo en el tercer trimestre de la gestación; en el cual las células migran y alcanzan su posición definitiva.^{21,22} El daño o interrupción del desarrollo cerebelar durante este complejo proceso; desencadenará secuelas en la adquisición de habilidades neurocognitivas, sociales y motoras.^{47,48} La prematurez se ha asociado como uno de los factores de riesgo mejor documentados que ocasiona lesiones cerebelares.²⁵

La cafeína es la metilxantina mas estudiada en los últimos años, existe gran entusiasmo por su administración en RN pretérmino y en forma temprana, debido a que ha demostrado reducir necesidad de ventilación mecánica, así como disminución en la incidencia de displasia broncopulmonar, sin embargo existe preocupación por los potenciales efectos adversos especialmente a nivel se sistema nervioso central en una población de elevado riesgo neurológico mayormente por su inmadurez. Las metilxantinas alteran el sistema monoaminérgico, el cual influye activamente en el proceso de migración y sinaptogénesis, además de disminuir las células de Purkinje, estrelladas y de canasta del cerebelo, con lo cual altera procesos de conexión cerebro-cerebelo, cambios en el flujo sanguíneo que condicionan hipoxia-isquemia y daño a las células de la capa granulosa y molecular.^{16,17,20}

Las metilxantinas bloquean neurotransmisores con funciones protectoras, por tanto podría incrementar el riesgo de apoptosis y daño en la sustancia blanca, desarrollar infartos y hemorragias cerebelares.^{18, 21,25}

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, la cafeína altera el periodo de desarrollo cerebelar, disminuye la migración celular, que reflejan el retardo en la maduración de la corteza cerebelosa, estos cambios en su desarrollo presentaran alteraciones en conexiones motoras, frontales, parietales y sistema límbico de la corteza cerebelar como se demostró en los estudios de Allin MP y Stoodley C.^{24,47}

Acerca de la cantidad de células, se cuantificaron tanto las hileras como el número de células en migración, en tres ventanas de 600 μm^2 las cuales fueron promediadas, y encontramos diferencia con significancia estadística ($p < 0.001$) coincidió en los grupos cafeína y cafeína +

oxígeno, un mayor número de células en migración e hileras de las mismas, atribuido a la interrupción de esta fase del neurodesarrollo, lo cual traduce demora en el proceso de proliferación, diferenciación y migración, en comparación con el grupo control que presentó menos hileras y consecuentemente menos células en migración. (Cuadro 3, grafica 3, grafica 4.), algunos informes han reportado con base a lo anterior que se altera el trofismo celular y la sinaptogénesis.²⁴

Las alteración en las características de la citoarquitectura más representativa se encontraron en las células de Purkinje, y con diferencia significativa en el grupo cafeína + oxígeno en contraste con el grupo control. Los cuerpos de las células de Purkinje conforman la capa intermedia de la corteza cerebelar, sus axones se proyectan hasta las capas granular, molecular y posteriormente a la sustancia blanca para hacer sinapsis en los núcleos intracerebelosos. Se consideran las células primarias cerebelares, e inician su desarrollo en las primeras semanas de gestación, y ayudan a mediar a través de la proteína *Sonic Hedgehog* la migración de la capa de células granulosas.²⁵ En el grupo expuesto a cafeína + oxígeno se encontraron cambios tales como: displasia, hiper Cromacia nuclear, gliosis periférica y necrosis celular, que podría atribuirse en parte a la sinergia entre el efecto de la cafeína y el daño del estrés oxidativo. Entre otras cosas estos cambios celulares podrían alterar las fases de proliferación, diferenciación y migración y sinaptogénesis, en diferentes linajes celulares cerebelares. En conjunto; los hallazgos anteriormente comentados podrían explicar, al menos en parte; el pobre pronóstico neurológico que observamos frecuentemente en pacientes prematuros.²⁵

Otro hallazgo interesante en nuestro experimento, fue el seguimiento del peso de las crías de los 3 grupos durante los días de intervención (gráfica 5), contrario a lo que esperábamos encontramos diferencia significativa entre el control negativo y el grupo cafeína + oxígeno, a favor de mayor ganancia ponderal en este grupo, ($p < 0.02$), no obstante se ha informado en estudios previos que uno de los efectos adversos de la cafeína es la disminución en la ganancia ponderal especialmente en las primeras 3 semanas posteriores al inicio del fármaco,^{31,49} y en el presente trabajo destacó que las crías con mayor ganancia ponderal fueron las expuestas a oxígeno y cafeína en contraste con el control negativo, situación que podría atribuirse a que de acuerdo a la metodología empleada en el presente trabajo, únicamente recibieron las intervenciones durante dos semanas y biológicamente no resulto ser el tiempo necesario para observar dicho efecto adverso, reportado en la literatura.

Se ha informado que los RNP presentan alteraciones en circuitos corticales cerebro-cerebelares, que afectan la coordinación y modulación de los movimientos gruesos y finos, y alteran funciones cognitivas en especial relacionadas al aprendizaje, memoria, lenguaje y asociados a problemas como dislexia y espectro autismo, con repercusión en el área socio-afectiva incluyendo emociones, percepción e interacción;^{24,47} Hubiese resultado deseable mantener con vida un grupo de crías expuesto a cafeína y evaluar capacidades de aprendizaje y destrezas motoras gruesos y finas.

El estudio de seguimiento neurológico "CAP" (*caffeine for apnea of prematurity*) en el cual se incluyeron dos grupos de RNP uno de ellos recibió (n=1006) y otro placebo (n=1000) iniciados en los primeros 10 días de edad postnatal, encontraron que en el grupo cafeína, se disminuyó la incidencia de displasia broncopulmonar, requirieron menos días bajo soporte ventilatorio y además se informó mejor evolución neurocognitiva en el seguimiento a 18 y 21 meses y menor incidencia de parálisis cerebral. El seguimiento de la misma cohorte a los 5 años de edad no mantuvo este hallazgo.³² El último estudio de seguimiento publicado en 2017, a los once años después de la administración de cafeína y del placebo, concluye que no encontraron disminución significativa en el rango académico, en actividades motoras o alteraciones en el comportamiento, pero si fue asociado a disminución del riesgo de alteraciones motoras del grupo que recibió cafeína, lo cual atribuyeron a que el grupo cafeína requirió menor tiempo de ventilación mecánica y menor presión media de vías aéreas, ya que ambos son predictores de pobre pronóstico neurológico en los RNP.³³

Probablemente el uso de metilxantinas demora y/o interrumpe fases críticas durante del desarrollo cerebelar, sin embargo esta etapa continua hasta los 20 meses de edad postnatal especialmente las conexiones con los núcleos profundos.²⁵ Por tanto aún quedan muchas interrogantes, como conocer si en fases posteriores del desarrollo exista posibilidad de recuperación y presentar algún tipo de regeneración por plasticidad celular, o si se tratan de cambios permanentes e irreversibles.

15.-Conclusiones

De acuerdo al conjunto de hallazgos obtenidos con la metodología empleada en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

- La administración temprana de cafeína altera el proceso de proliferación, diferenciación y migración celular, afecta el desarrollo cerebelar y sus vías de conexión con otras estructuras.
- Los resultados muestran que al décimo quinto día de edad postnatal, de las crías tratadas con cafeína y cafeína + oxígeno en contraste con el grupo control negativo, presentaron demora en la madurez cerebelar.
- En ambos grupos de intervención se encontraron mayor número de células en migración, lo cual denota inmadurez y representa riesgo neurológico.
- El grupo cafeína + oxígeno presentó múltiples alteraciones en las células de Purkinje, tales como hipercromacia nuclear, displasia, gliosis, degeneración, necrosis celular, atribuido a la sinergia entre la cafeína y el estrés oxidativo.
- El grupo cafeína + oxígeno presentó mayor ganancia ponderal, en comparación al control.

16.- Referencias bibliográficas

1. Gómez M, Danglot C, Aceves M. Clasificación de los recién nacidos. *Rev Mex Pediatría*. 2012;79: (1) 32-39
2. Barfiel W. The committee on fetus and newborn. *Pediatrics* 2011;128:77-81.
3. Yerushalamy J, The classification of newborn infant by birth weight and gestational age. *Pediatr* 1967;71:164-72.
4. Gladstone M, Oliver C, Van den Broek N. Survival, Morbidity, growth and developmental delay for babies born preterm in low and middle income countries. A Systematic Review of outcomes measured. *PloSOne*. 2015;10: (3) 0120566.
5. Hartling L, Lian Y, Lacaze-Masmonteil T. Chorioamnionitis as a risk factor bronchopulmonary dysplasia: a systemic review and meta-analysis. *ArchDisChild Fetal Neonatal Ed*. 2012; 97: F8 – F 17.
6. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from NICHD neonatal research network. *Pediatrics*. 2010; 126: 443-456.
7. Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development. *Early Hum Dev* 2007; 83 (12): 789-794.
8. Cloutier M, Tremblay M, Piedbouef B. ROCK2 is involved in accelerated fetal lung development induced by in vivo lung distension. *PediatrPulmonol* 2010; 45: 966-976.
9. Mathew OP. Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. *J Perinatol*. 2011; 31: 302-310.
10. Martin RJ, Abu-Shaweesh JM, Baird TM. Apnea of prematurity. *PaediatrRespir Rev*. 2004; 5: Suppl A 377-382.
11. Bhatia J. Current options in the management of apnea of prematurity. *ClinPediatr*. 2000; 39: 327-333.
12. Zhao J, Gonzalez F, Mu D. Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur J Pediatr*. 2011; 170: 1097-1105.
13. Di Fiore JM, Martin RJ, Gauda EB. Apnea of prematurity – Perfect storm. *RespirPhysiolNeurobiol*. 2013; 189(2): 213-222.
14. Poets CF. Interventions for apnea of prematurity: a personal view. *ActaPaediatrica*. 2010; 99: 172-177. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of Caffeine on human health. *FoodAddContam*. 2003; 20(1): 1-30.
15. Kreutzer K, Bassler D. Caffeine for Apnea of Prematurity: A Neonatal Success Story. *Neonatology*. 2014; 105: 332–336.
16. Alur P, Bollampalli V, Bell T, Hussain N, Liss J. Serum caffeine concentration and short term outcomes in premature infants of ≤ 29 weeks of gestation. *J Perinatol* 2015; 35: 434-438.
17. Abdel-Hady H, Nasef N, Shabaan AE, Nour I. Caffeine therapy in preterm infants. *World J ClinPediatr*. 2015; 4(4): 81-93.
18. Pardo-Lozano R, Álvarez-García Y. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*. 2007; 19(3): 225-238.
19. Lista G, Fabbri L, Polackova R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. The real-world routine use of caffeine citrate in preterm infants: a European postauthorization safety study. *Neonatology*. 2016; 109: 221-227.
20. Limperopoulos C. The vulnerable immature cerebellum. *Semin fetal Neonatal Med* 2016: 21: 293-294.
21. Bosemani T, Poretti A. Cerebellar disruptions and neurodevelopmental disabilities. *Semin fetal Neonatal Med* 2016: 21: 339-348.
22. George JM, Boyd RN, Colditz PB, Rose SE, Pannek K, Fripp J, et al. PPREMO: a prospective cohort study of preterm infant brain structure and function to predict

- neurodevelopmental outcome. *BMC Pediatrics*. 2015; 15: 123-139.
23. Souza AC, Souza A, Fernández-Medeiros L, de Oliveira C, et al. Maternal Caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring. *Brain Res* 2015; 1595: 10-18.
 24. Allin MPG. Novel insights from quantitative imaging of the developing cerebellum. *Semin fetal Neonatal Med* 2016; 21: 333-338.
 25. Pierson CR, Sufiani FA. Preterm birth and cerebellar neuropathology. *Semin fetal Neonatal Med* 2016; 21: 305-311.
 26. Kaliste E. *The Welfare of Laboratory Animals*; Springer; 2007; 2; 154-158. 19.
 27. Hernandez T. *Biomedicina*. 2006, 2 (3) - 252-256 ISSN: 1510-9747
 28. Hernandez G. R. *Manual en Ciencias de los Animales de Laboratorio*; Primera edición; INCMNSZ; 2004; 26.
 29. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, et al. Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity. *N Engl J Med* 2006; 354: 2112-2121.
 30. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, et al. Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med*. 2007; (19): 1893-902.
 31. Schmidt B, Anderson BJ, Doyle LW, Dewey D, et al. Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA* 2012; 307: 285-292.
 32. Schmidt B, Roberts R, Anderson PJ, Asztalos EV, et al. Academic Performance, Motor Function, and Behavior 11 Years After Neonatal Caffeine Citrate Therapy for Apnea of Prematurity: An 11-Year Follow-up of the CAP Randomized Clinical Trial. 2017; (171) 6, 564 – 572.
 33. Park HW, Lim G, Chung HS, Kim KS, Kim SN. Early Caffeine Use in Very Low Birth Weight Infants and Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis *J Korean Med Sci*. 2015; 30(12):1828-1835.
 34. Bloch-Salisbury E, Hall MH, Sharma P. Heritability of apnea of prematurity: a retrospective twin study. *Pediatrics*. 2010; 126 (4):779–787.
 35. Chavez Valdez R, Ahlawat R, Wills-Karp M, Gauda EB. Mechanisms of modulation of cytokine release by human cord blood monocytes exposed to high concentration of caffeine. *Pediatr Res*. 2016; 80 (1): 101-109.
 36. Chavez Valdez R, Ahlawat R, Wills-Karp M, Nathan A, Ezell T, Gauda EB. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants. *J Pediatr*. 2011; 158 (1): 57-64.
 37. McPherson C, Neil JJ, Tjoeng TH, Pineda R, Inder TE. A pilot randomized trial to high dose caffeine therapy in preterm infants. *Pediatr Res* 2015; 78 (2): 198-204.
 38. Marín-Padilla M. The pyramidal cell and its local-circuit interneurons: a hypothetical unit of the Mammalian cerebral cortex. *J Cogn Neurosci*. 1990; 2(3):180-94. doi: 10.1162/jocn.1990.2.3.180.
 39. Pablos MI, Reiter RJ, Chuang JI, Ortiz GG, Guerrero JM, Sewerynek E, et al. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1997; 83(2): 354-358.
 40. Cochran W, Cox G. *Diseños Experimentales*. 2da Ed, Ed Trillas, México. 1990; 35–42.
 41. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35: 234–252.
 42. Poole T. *The UFAW handbook on the care & management of laboratory animals*. 6a. ed. Logman Scientific & Technical, USA. 1994. P 209.
 43. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*. Secretaría de Agricultura. Ganadería, Desarrollo

Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, México. 2001.

44. Belda E, Laredo FG, Escobar M, Agut A. Agonistas α -2 adrenérgico en sedación y anestesia. *Acta N veterinaria*. Murcia 2005; 21: 23-33.
45. Rahman M, Zhu D, Lindblad C, Johansson IM, et al. GABA-site antagonism and pentobarbital actions do not depend on the alpha-subunit type in the recombinant rat GABA receptor. *ActaPhysiol (Oxf)*. 2006 Aug;187(4):479-88.
46. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
47. Stoodley C, Limperopoulos C. Structure- function relationships in the developing cerebellum: Evidence from early life cerebellar injury and neurodevelopmental disorders. *Seminars in fetal and neonatal medicine* 2016; 21:356 -364.
48. Gano D, Ferreiro D, Altered cerebellar development in preterm newborns : Chicken or egg?. *The journal of pediatrics*, 2016.
49. Lodha A, Seshia M, McMillan DD, Barrington K, et al. Association of early caffeine administration and neonatal outcomes in very preterm neonates. *JAMA Pediatr*. 2015; 169: 33-38.

17.- Anexos

Cronograma de actividades 2016 – 2017

EFFECTO DE LA CAFEÍNA EN EL DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA NEONATO SOMETIDAS A AMBIENTE HIPERÓXICO

Actividad	1er semestre	2do semestre	3er semestre	4to semestre
Presentación del protocolo	X			
Estandarización de métodos	X	X		
Desarrollo del modelo experimental e intervenciones	X	X		
Sacrificio, disección y toma de muestras		X	X	
Procesamiento, observación de cortes histológicos, análisis por Neuropatólogo			X	
Análisis e interpretación de resultados			X	X
Reporte preliminar				X
Redacción del informe final				X

CONSTANCIA DONACIÓN CAFEÍNA



Ciudad de México a 22 de Abril de 2017

Dra. Lourdes Lemus Varela
Adscrita en el área de pediatría
UMAE 48 HOSPITAL GINECO-PEDIATRIA

PRESENTE

Por medio de la presente le informamos que Chiesi México está interesado en apoyar la educación médica continua y la investigación científica. Tenemos el conocimiento que el HOSPITAL UMAE 48 DE GINECO-PEDIATRIA en conjunto con el CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE DEL IMSS, actualmente desarrolla un experimento con crías de rata Wistar y los efectos del citrato de cafeína, por lo que Chiesi ha decidido donar 4 cajas de citrato de cafeína (PEYONA®) para dicho fin.

Es importante señalar que las piezas son entregadas sin cargo y no generan un compromiso económico para los investigadores.

Se emite el presente escrito en cumplimiento de informar sobre las actividades de Market Research.

Sin más por el momento quedo a sus órdenes para cualquier duda o comentario.

Aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente



Cynthia Torres Gutiérrez
Gerente de mercadotecnia
Chiesi México



Víctor Luna Díaz
Gerente Nacional de ventas
Chiesi México

CONSTANCIA CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE



CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE
Sierra Mojada # 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jal., 44340, México
Fax(+52) (33) 3618-1756, TEL. 3668-3000 ext. 31950

Guadalajara, Jal., a 23 de febrero de 2017.

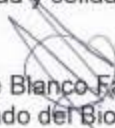
Comité de Bioseguridad
Comité de Investigación en Salud

Por este conducto me permito manifestar la disponibilidad del bioterio del CIBO en el proyecto titulado: **Efectos de la cafeína en el desarrollo de la corteza cerebral en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico**, cuyo registro se encuentra en trámite ante el Sirelsis y la responsable es la Dra. María de Lourdes Lemus Varela del Departamento de Neonatología de la UMAE del Centro Médico Nacional de Occidente en colaboración con investigadores del CIBO incluyendo a la Dra. Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza, el Dr. Genaro Gabriel Ortiz y el MVZ David Zeferino García Martínez.

Existen las condiciones adecuadas para la reproducción y mantenimiento de los animales en este Bioterio a mi cargo, así como la disponibilidad de proporcionar los animales requeridos (5 ratas y sus crías) en las condiciones requeridas para este proyecto, en el periodo que dure la fase experimental.

Se extiende la presente a petición de las interesadas y para los fines de investigación que existan.

Atentamente
Seguridad y solidaridad social.


Dr. José Blanco Fabela
Encargado del Bioterio, CIBO, IMSS

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL PRTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

SIREL/CIS

Página 1 de 1

MÉXICO

Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



27 de marzo del 2017

Ref. 09-B5-61-2800/201700⁰⁹⁶¹

Dr. Lemus Varela Ma. de Lourdes
DIVISION DE PEDIATRIA MEDICO QUIRURGICA
Jalisco


Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Efectos de la cafeína en el desarrollo de la corteza cerebelar en un modelo experimental en rata neonato sometidas a ambiente hiperóxico**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2017-785-029.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,


Dr. Fabio Salazar Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

SNN/Jul. F-CNIC-2017-1

IMSS

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Av. Potosí 47, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México DF, C.P. 06702, Tel. 55 23 04 00, 55 23 04 01, 55 23 04 02, 55 23 04 03, 55 23 04 04, 55 23 04 05, 55 23 04 06, 55 23 04 07, 55 23 04 08, 55 23 04 09, 55 23 04 10, 55 23 04 11, 55 23 04 12, 55 23 04 13, 55 23 04 14, 55 23 04 15, 55 23 04 16, 55 23 04 17, 55 23 04 18, 55 23 04 19, 55 23 04 20, 55 23 04 21, 55 23 04 22, 55 23 04 23, 55 23 04 24, 55 23 04 25, 55 23 04 26, 55 23 04 27, 55 23 04 28, 55 23 04 29, 55 23 04 30, 55 23 04 31, 55 23 04 32, 55 23 04 33, 55 23 04 34, 55 23 04 35, 55 23 04 36, 55 23 04 37, 55 23 04 38, 55 23 04 39, 55 23 04 40, 55 23 04 41, 55 23 04 42, 55 23 04 43, 55 23 04 44, 55 23 04 45, 55 23 04 46, 55 23 04 47, 55 23 04 48, 55 23 04 49, 55 23 04 50, 55 23 04 51, 55 23 04 52, 55 23 04 53, 55 23 04 54, 55 23 04 55, 55 23 04 56, 55 23 04 57, 55 23 04 58, 55 23 04 59, 55 23 04 60, 55 23 04 61, 55 23 04 62, 55 23 04 63, 55 23 04 64, 55 23 04 65, 55 23 04 66, 55 23 04 67, 55 23 04 68, 55 23 04 69, 55 23 04 70, 55 23 04 71, 55 23 04 72, 55 23 04 73, 55 23 04 74, 55 23 04 75, 55 23 04 76, 55 23 04 77, 55 23 04 78, 55 23 04 79, 55 23 04 80, 55 23 04 81, 55 23 04 82, 55 23 04 83, 55 23 04 84, 55 23 04 85, 55 23 04 86, 55 23 04 87, 55 23 04 88, 55 23 04 89, 55 23 04 90, 55 23 04 91, 55 23 04 92, 55 23 04 93, 55 23 04 94, 55 23 04 95, 55 23 04 96, 55 23 04 97, 55 23 04 98, 55 23 04 99, 55 23 04 00

Bitácora recolección de datos

(Se utilizará una hoja de datos para cada grupo de estudio)

(GRUPO CONTROL NEAGTIVO, GRUPO CAFEÍNA, GRUPO CAFEÍNA- OXÍGENO)

Número de Cría	1	2	3	4	5	6	7	8
CGE								
CM								
Celulas Purkinje								
Hilera de células								
Célulasenmigración								

CONTROL PESO														
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	DIA 11	DIA 12	DIA 13	DIA 14
CRIA 1														
CRIA 2														
CRIA 3														
CRIA 4														
CRIA 5														
CRIA 6														
CRIA 7														
CRIA 8														

Glosario de abreviaturas:

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

CGE: Capa granular externa

CIBO: Centro de Investigación Biomédica de Occidente

CM: Capa molecular

CO₂: Dióxido de carbono

CPAP: Presión positiva continua a las vías aéreas

CMNO: Centro Médico Nacional de Occidente

CPAP: Presión positiva continua de la vía aérea

DBP: Displasia broncopulmonar

DS: Desviación estándar.

EG: Edad gestacional.

EP: Edad postnatal.

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno.

G: Gramos.

GABA: Ácido gama amino butírico.

GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social.

Kg: Kilogramo.

Lt: Litros.

ml: Mililitros.

Min: Minutos.

NIPPV: ventilación con presión positiva intermitente nasal.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

OR: Odds ratio.

PaO₂: Presión Parcial de Oxígeno.

PEEP: Presión positiva al final de la expiración.

RN: Recién nacido.

RNP: Recién nacido pretérmino.

SDG: Semanas de gestación.

SDR: Síndrome de distress respiratorio.

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences.

UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad.

UTIN: Unidad de Terapia Intensiva Neonatal.