



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Hipoxia-iskemiaren kalteak
arratoien entzumen sisteman eta
behe kolikuluko neuronetan eta
antioxidatzaileen eragin
onuragarriak**

*M. Revuelta, O. Arteaga,
A. Martinez-Ibargüen, E. Hilario
eta A. Alvarez*

768-775 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.107>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Hipoxia-iskemiaren kalteak arratoien entzumen sisteman eta behe kolikuluko neuronetan eta antioxidatzaileen eragin onuragarriak.

Revuelta M¹, Arteaga O¹, Martinez-Ibargüen A², Hilario E¹, Alvarez A¹
Biologia Zelular eta Histologia saila¹, Otorrinolaringologia eta Oftalmologia saila², Medikuntza eta Odontologia fakultatea. EHU
e-posta: mrevuelta006@ikasle.ehu.es

Laburpena

Entzumen bidearen garapena, nerbio sistema zentralaren mielinizazioaren menpekota da eta entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa bezalako gaitzengatik kaltetua gerta daiteke. Gure helburua, entzumen bidearen funtzio egokia ebaluatzea eta metodo histologiko eta molekularren bitartez sortutako kaltea ikustea izan da eta ondoren antioxidatzaileen bitartez tratatzea, 7 eguneko Sprague Dawley arratoiak erabiliz. Gure emaitzek antioxidatzaileen onurak baieztatzen dituzte bai entzumen gaitasunean zein entzefalo enborreko neuronen morfologian ere.

Hitz gakoak: Hipoxia-iskemia (HI), entzumen gaitasuna, entzefalo enborreko entzumeneko erantzuna (ABR), behe-kolikulua, arratoiak

Abstract

Maturation of the auditory pathway is dependent upon central nervous system myelination and it can be affected by pathologies such as neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Our aim was to evaluate the functional integrity of the auditory pathway and to visualize by histological and molecular methods, the damage to the brainstem using a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. Our results support the hypothesis that antioxidant treatments have a protective effect on the functional changes of the auditory pathway and on the morphological damage after hypoxic ischemic insult.

Keywords: Hypoxic- ischemic injury (HI), auditory threshold, auditory brainstem response (ABR), inferior colliculus, rats.

1. Sarrera eta motibazioa

Mundu osoan zehar 70 milloi pertsona inguruk entzumen gaitasunen bat pairatzen duela uste da gizakiaren ohiko gaitz neurosensorial bat izanik. Heldu garaian, entzumen ezintasuna, lehen 10 gaixotasun nagusien artean sailka dezakegu, gizon zein emakumeei era berean kaltetzen dituen gaixotasunen sailkapenetatik 5.a lekuan izanik.

Entzumen ezintasunen zergaitien artean, arazo perinatalak %18 dira (Birgit Mazurek et al., 2006), 1000 jaio berrietatik 2tan gertatzen den gaitza delarik, eta arazoaren aurkikuntza azkarrak teknika berezien beharra dauka, jaiotze momentuan bertan erabili ahal direnak hain zuzen ere (Moreno-Aguirre et al., 2012).

Soinuaren monitorizazioa

Jaio berrien entzumen gaitasuna neurtzeko metodo espezifiko zein sentikorrak beharrezkoak dira eta gehien erabiltzen diren artean emizio otoakustikoak eta entzumeneko potentzial ebokatuak aurki ditzakegu (Bogacz et al., 1985). Potentzial ebokatu hauek, estimulu akustiko baten ostean sortzen diren eta entzumen bidean zehar gertatzen diren boltaje aldaketak neurtzen ditu. Potentzial hauek ondorengo arrazoiengatik gertatu ahal dira:

- Neuronaren despolarizazioaren ostean sortzen diren akzio potentzialak.
- Potentzial postsinaptikoak kitzikatzaileak edo inhibitzaileak izan daitezkeenak. (Plourde, 2006)

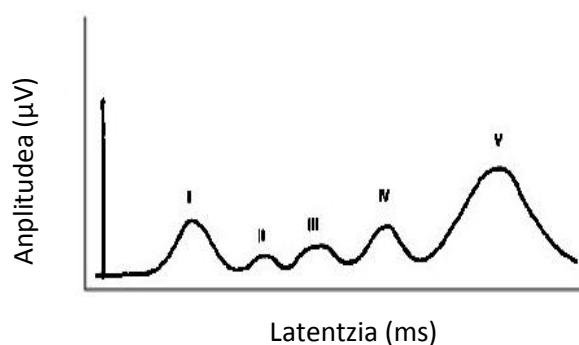
Estimuluaren intentsitatearen aldaketek, uhinen anplitude zein latentzia aldaketak dakartzate baina baita beraien morfologia ere.

Soinuaren interpretazio zein errepresentazioa

Entzefaloko enborraren entzumeneko erantzunaren (ABR) neurketa egitean, uhin baten 5 tontor desberdin ditzakegu (1.irudia), hauetariko bakoitza egitura anatomiko baten erantzunari dagokiona. Estimuluaren intentsitateak entzumen ataria sortzen du eta era honetan 40dB tik beherako atariak dituzten pertsonen hipoakuak diagnostikatzea ahalbidetzen digu.

- Entzumen nerbioa = I. tontorra
- Koklear nukleoak = II.tontorra
- Goi oliba = III.tontorra
- Aldeko leminiskoa = IV.tontorra
- Behe kolikulua = V.tontorra

1.irudia: Estimulu akustiko baten ondorioz sortutako entzefalo enborraren entzumeneko erantzuna non uhinen 5 tontorrek egitura anatomiko baten erantzunari dagozkien.



Entzefalopatia Hipoxiko Iskemikoa

Entzefalopatia Hipoxiko Iskemikoa (HI), oxigeno kontzentrazioa murriztearen eraginez (O_2) edo odol fluxuaren gutxitzaren eraginez gertatzen da, asfixia baten ondorioz gerta daitekeena (Caplan, 2000; Volpe, 1995). Asfixia perinatalak arazo neurologiko ugari dakartza, erditzeren ostean agertzen direnak, hala nola, esnatzeko arazoak, muskuluko tonoen aldaketak eta erantzun motor eta reflexuen galtzea. Kaltearen nolakoa asfixia mailaren eta iraupenaren arabera da (Johnston, 1998; Hilario et al., 2006; Alvarez-Díaz et al., 2007) eta baita ahultasun mailatan arabera ere, hau selektiboa baita zelularekiko. Azken honek, zelula batzuk hiltzea eta beste batzuk ilunantz iskemiko batean sartzea eragiten du, aurrerago nekrosi edo apoptosian sar daitezkeenak (Heriotza atzeratua).

Asfixia (hipoxia) eta iskemia batek, kalte fisiologikoetaz gain, zelula mailan ere kalte ugari sortzen ditu, batez ere neuronetan, oxigeno murrizketaren aurrean ahulenak diren zelulak direlako, baina hauetaz gain zelula glialak ere kaltetuak ager daitezke (Hilario et al., 2005; Goñi-de-Cerio et al., 2007). Egoera hauetan, oligodendroito zein astrozitoak kitzikatzeko gaitasun handiagoa dute eta baita erradikal askeak sortzeko ere eta ondorioz, apoptosi bidezko heriotza pairatzeko arrisku gehiago ere (Inder eta Volpe, 2000; Alvarez et al., 2007).

Entzefalopatia hipoxiko iskemikoa eta entzumena

Ikerketa esperimental zein klinikoek, hipoxia-iskemiak entzumen gaitasunaren galeran eragina duela baieztatu dute. Izan ere, entzun bide neuralen garapena nerbio sistema zentralaren mielinizazioarekin erlazionatuta dago (Hepper eta Shadidullah, 1994) eta mielinizazio eta garapen egokia kaltetuak gerta daitezke hainbat gaitzen ondorioz, hauetariko bat entzefalopatia hipoxiko iskemiko neonatala izanik.

Entzumen atariaren aldaketak

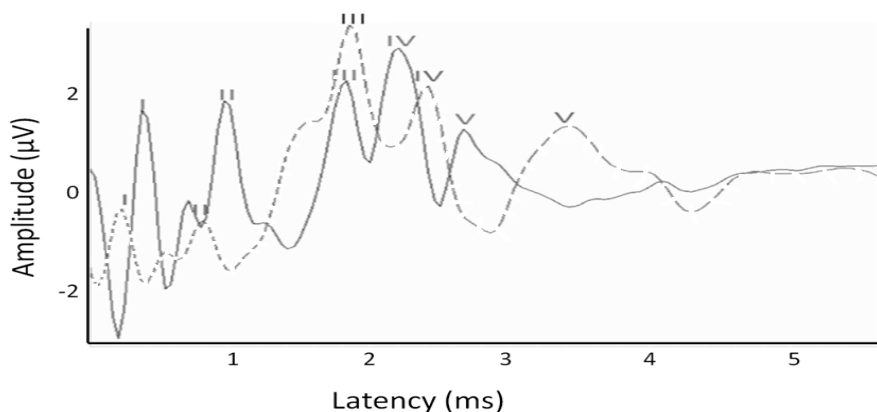
Aurretik egindako hainbat ikerketek, ABRek oxigeno kontzentrazioarekiko sentikortasun handia dutela erakutsi dute, hain zuzen ere, kontzentrazio hau gutxitzeak, Cortiren organoan kalte neurosensorialak eragiten ditu eta baita entzefaloko enborreko nukleoan galera ere, hala nola, koklear nukleoan eta behe kolikuloko neuronan galera (Freeman, 1991; Johnston, 2001). Kaltea neurtzeko orduan, V. tontorraren latentzia zein I. tontoretik V.-era dagoen latentzia tarteak dira gehien erabiltzen diren parametroak, parametro hauek neuronan garraioarekin guztiz erlazionaturik daudelarik eta baita funtzio sinaptiko zein mielinizazioarekin ere (Tomimatsu et al., 2003).

Parametro hauen aldaketak, latentzia zein anplitudeak aldaturik daudela esan nahi du eta ondorioz entzumen bidean arazoak daudela (Jiang et al., 2008).

Honela, lehen tontorraren latentzia normala baino atzeratuagoa badago, entzumen sistema periferikoko estrukturak kaltetuak daudela esan nahi du eta kaltea entzefalo enborreko barne sisteman kokatzen bada berriz, IV-V. tontorren latentzien denboraren atzerapenekin edo hauen desagerpenekin erlazionatzen da (Wilkinson eta Jiang, 2006; Simpson et al., 1985).

Hipoxia-iskemia baten ostean ABRek aldaketak aurkitu dira aurreko ikerketa batzuetan, hala nola, erantzun atariaren handiagotzea, latentzien handiagotzea, garraio denbora luzatzea, anplitudea murriztea, eta baita lehen eta azken tontorren arteko tarteen anplitude zein latentzien aldaketa ere (Hecox eta Cone, 1981; Jiang et al., 2009; Wilinon eta Jiang, 2006) (2.irudia).

2.irudia. 7 eguneko Sprague Dawley arratoiaren entzumen gaitasunaren irudi adierazgarria non estimulu akustiko baten ostean entzumen bidearen lehen 10 ms etako egitura anatomiko ezberdinen erantzunak agertzen diren. Zuzen baten bitartez animalia kontrol bat eta marra etenena bitartez animalia hipoxiko-iskemiko bat.



Elektrofisiologian aurkituriko kalte hauek ikerketa histopatologikoekin erlazionatzen dira, entzefalo enborreko behe kolikuloko neuronak kaltetuak agertzen direla hain zuzen HI baten ondorioz. Gainera, gaur egun ditugun ezagutza biokimiko zein molekularrei esker, geroz eta alternatiba terapeutiko gehiago frogatzen ari dira, asfixia perinatalak dakartzan ondorioak ekiditeko edo murrizteko.

Oxigenoaren espezie erreaktiboak HI ostean sortzen direnez, galera honen tratamendu bezala antioxidatzaileak aztertu dira neuronan (Moosmann eta Behl, 2002; McMahon et al., 2006). Antioxidatzaile ugari izan dira aurretik aztertu direnak baina guk hipokanpoan eragin onuragarriak baieztatu dituzten antioxidatzaileen ikerketetan sakondu nahi izan dugu eta honen arabera, Melatonina, Resberatola, DHA (azido dekosanoikoa) eta Nicotinaren azetilkolina hartzailea (nAChR) erabili ditugu gure ikerketetarako. DHA, lehenagotik deskribatu da antioxidatzaile neuroprotektore bezala hipoxia iskemia baino 1h-3h artean ematen denean (Pan HC, 2009), Resberatola HI baino 10-15 min lehenago ematen denean (Huang, 2000; West et al., 2007) eta Nicotina 2 ordu lehenago ematen denean (Chen et al., 2013). Melatoninaren eragina ordea, kaltearen ostean administratzen denean babes maila altuagoa duela ikusi da (Carlioni et al., 2008; Cetincaya et al., 2011; Alonso-Alconada, 2012).

Helburua

Gure lanaren helburua hainbat antioxidatzailek behe kolikuloko neuronetan eta entzumen bidearen elektrofisiologian duen eragina ikustea izan da, HI baten ondorioz gertatzen diren entzumen bideko kalteak murriztu ahal izateko 7 egunetako arratoieta. Honetarako, Resberatrola, DHA, Melatonina eta Nikotina erabili ditugu antioxidatzaile bezala eta hainbat froga histologiko, elektrofisiologiko zein molekularren bitartez kaltea nolakoa izan den eta kalteak murriztu diren edo ez aztertzen saiatu gara.

Metodologia

Gure lana burutzeko, 7 eguneko Sprague Dawley arratoiak erabili ditugu 6 talde esperimentaletan banaturik: Kontrolak, HI taldea, HI + Nikotina, HI+ Melatonina, HI + Resberatrola eta HI+ DHA taldea. Tratamenduak hipoxia eragin aurretik zein ostera eman genituen, aurrerago emandako bibliografia kontuan izanda:

Tratamendua	Dosia	Disoluzioa	Administration denborak
Nikotina (N)	1.2 mg/kg	Serum gazia	Hipoxia baino 2h lehenago
Melatonina (M)	15 mg/kg	Serum gazia eta DMSO 5%	Hipoxiatik 10 minutura
Resberatrola (RV)	20 mg/kg	DMSO	Hipoxia baino 10 min lehenago
Docosahexaenoic acid (DHA)	1 mg/kg	HSA %25 Serum gazian disolbatuta	Hipoxia baino 10 min lehenago

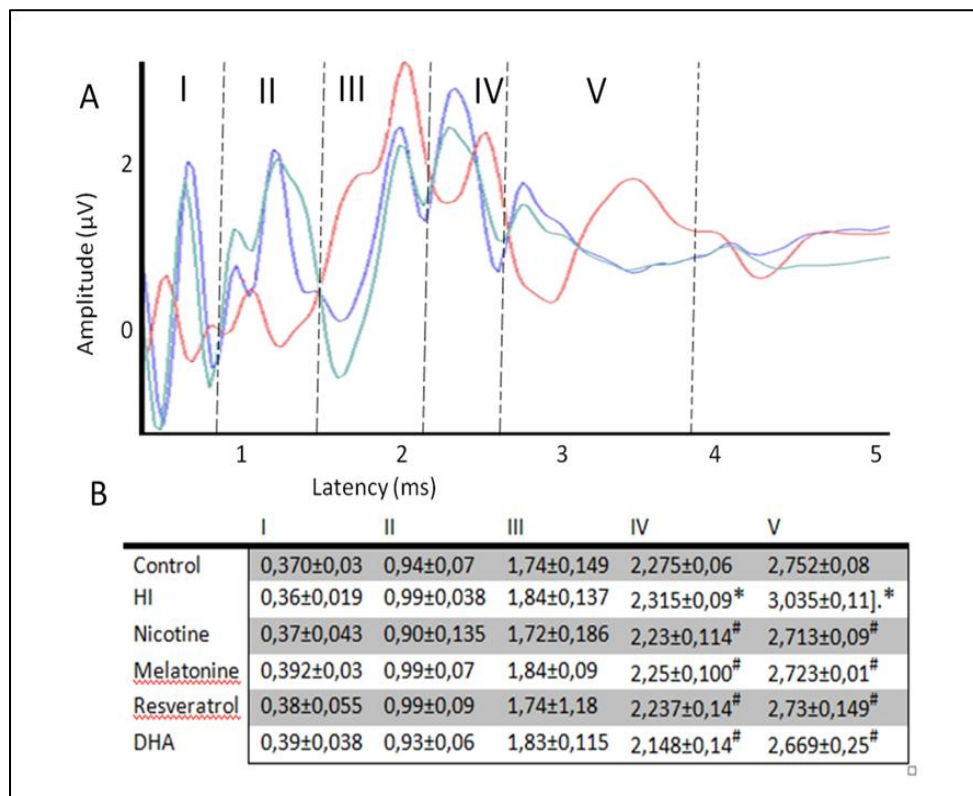
Elektrofisiologia neurtzeko ABR-ak erabili ditugu, hau da entzefaloko enborraren entzumeneko erantzunak eta ondoren azterketa histologiko zein molekularrak egin ditugu, elektrofisiologia lortutako emaitzetan gehiago sakontzeko. Histologia aztertzeko hematoxilina-eosina tindaketa egin dugu, neuronen morfologia ikusteko, ondoren mielyn binding protein (MBP) tindaketa oligodendroitoak aztertzeko eta glial fibrillary acid protein (GFAP) astrozitoak aztertzeko. Azkenik azterketa molekularra egin dugu mitokondrioen potentzial eta integritatea aztertuz fluxuzko zitometria bitartez, honetarako bi fluorokromo erabiliz, Rhodamina 123 eta NAO (Nonyl Acridine Orange).

2. Ikerketaren muina

Gure emaitzek lehen aldiz baieztatzen dute antioxidatzaileekin egindako tratamendua burmuineko beste toki batzuetan bezala, entzumen-bidean zehar ere HI baten ondorioz gertatutako kalteak murrizten dituztela.

Alde batetik, elektrofisiologiari dagokionez IV zein V. tontorren denborarekiko luzapena gertatzen dela ikus dezakegu hipoxia iskemiaren ostean eta tontor hauen latentziaren luzera ez dela agertzen antioxidatzaileen kasuan, hau da, animalia kontrolen antzeko elektrofisiologia dute animalia tratatu gehienak (3.irudia). IV.tontorra leminiskoak egiten duen erantzunari dagokio eta V.a berriz behe kolikuloak egiten duen erantzunari. Histologian behe kolikuloan soilik ikusi ditugunez aldaketa morfologikoak, behe kolikuloko azterketetan oinarrituko gara hemendik aurrera.

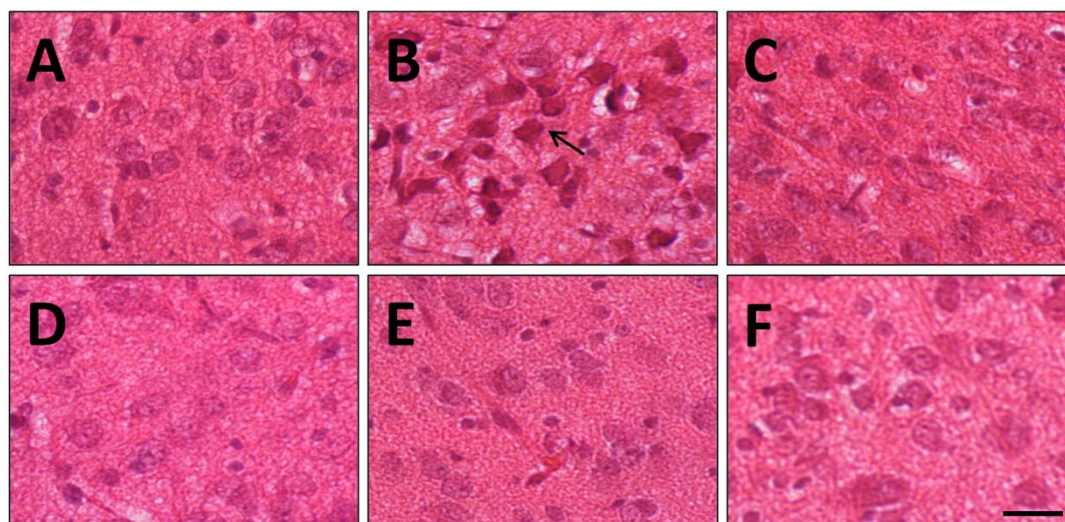
irudia: 7 eguneko Sprague-Dawley arratoien elektrofisiologiaren emaitza adierazgarriak. A) Egitura anatomiko ezberdinen erantzunen latentzia zein anplitudeak B) Antioxidatzaileekin tratatutako animalien elektrofisiologiako erantzunen batzuekikoak.



Histologiari dagokionez berriz, behe kolikuloko neuronen morfologia mantentzen dela ikusi dugu antioxidatzaileekin tratatuz gero, hipoxikoen kasuan zitoeskeletoa kontzentratua agertzen delarik, morfologia aldakorrek eta tamaina handiak, kaltetuak dauden seinale hain zuzen ere (4. irudia) . Astrozitoen kasuan ere, astrogliosis aztertzerako orduan hipoxikoen kasuan erreaktibitate maila handiagoa da kontrolekin konparatzen baditugu eta hau ez da gertatzen tratatutako animalietan.

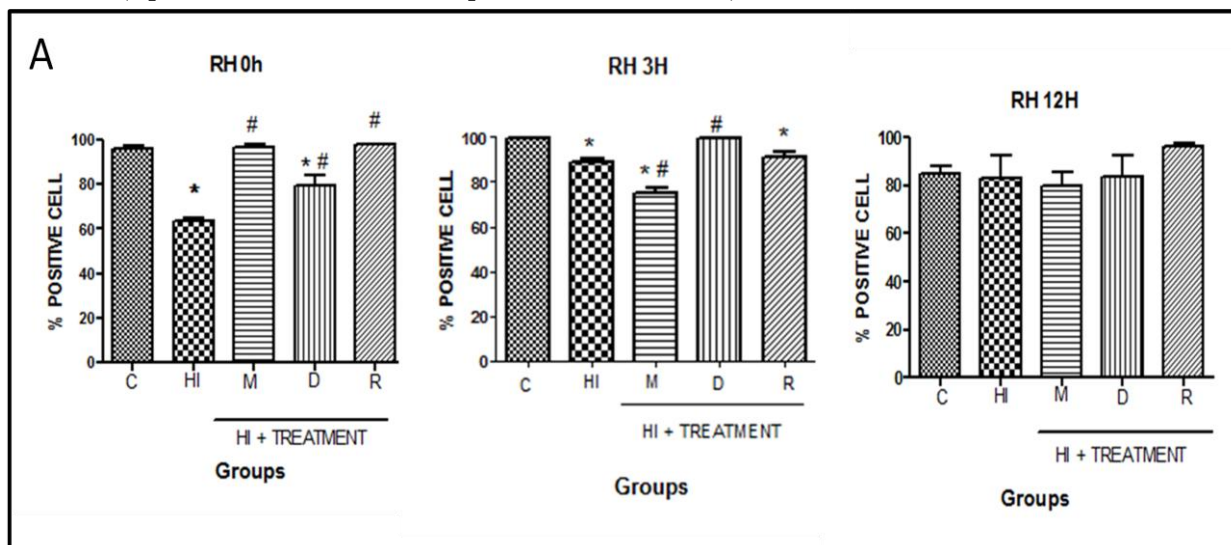
Oligodendrozitoak aztertzean, mielina kontzentrazio baxuagoa dute animali hipoxikoek eta hau ez da horrela antioxidatzaileekin tratatutako animalietan, kaltea txikiagoa den seinale izan daitekeelarik.

4.irudia: Hematoxilina-eosinaz tindaturiko laginak non neuronak desberdin ditzakegun. A)Animalia kontrolak, B) HI, C-F) Tratatutako animaliak.



Azkenik, mitokondriari dagokionez ere, mitokondriaren potentzial zein integritatea guztiz kaltetua agerzen da animali hipoxikoetan eta trataturiko animalietan desberdintasunak azaltzen dira kaltearen lehenengo orduetan (5.irudia).

5.irudia: Rhodamina 123 markatzailea, mitokondriaren interitatea adierazten duena, fluxuzko zitometrian neurtuta kaltearen ostean eta ordu ezberdinetan. Taldeen batzbestekoak ikus ditzakegu HI ostean, 9 ordutara, 3 ordutara eta 12 ordutara. Datuak taldeen batzbestekoak + SEM bezala daude adierazita (* $p < 0.05$ vs. Kontrolak eta # $p < 0.05$ vs HI, ANOVA).



3. Ondorioak

Gure emaitza guztiak kontuan hartzen baditugu, lehen ardiz aurkezten dugu morfologia eta funtzionalitatearen arteko korrelazioa entzumen sisteman zehar HI baten ostean eta antioxidatzaileen onurak kalte honen ostean neuronen babesa bermatzen dutelarik asfisia perinatal baten ostean. Guk dakigunez hau da lehen aldia non Nikotina, Melatonina, Resberatrola eta DHA antioxidatzaileen babesa forgatzen den bai funtzionalki zein histologikoki eta molekularki ere entzumen gaitasunean eta behe kolikuloko neurona, glia zein mitokondrien integritatean.

4. Etorkizunerako planteamendua

Ikerketa guzti hau 7 egunetako Sprague Dawley animalietan egin da eta honetarako aurretikan egindako ikerketetan oinarritu gara. Izan ere, erabilitako antioxidatzaileak burmuineko beste eskualde batzuetan onuragarriak izan daitezkeela frogatuta dago baina inork ez zeukan aurretikan aztertua entzumen bidearen kalteak ezta behe kolikuloko neuronen kalteak ere. Beraz gure helburua, tratamendu hauen onurak ikusi ostean, gizakiarekin antz gehiago duen beste animalia modelo batetan ikerketa gauzatzea da, esaterako, txerrian, zeinetan bere entzumen bidea aztertu, hipoxia iskemiaren eraginak ikusi eta azken planteamendu bezala tratamendu hauen eragina aztertu beharko litzake.

5. Erreferentziak

- Alonso-Alconada D, Alvarez A, Lacalle J, Hilario E. (2012). Histological study of the protective effect of melatonin on neural cells after neonatal hypoxia-ischemia. *Histol. Histopathol* . 27. 771-783.
- Alvarez A, Hilario E, Goñi de Cério F, Valls-i-Soler A, Alvarez-Díaz FJ. (2007). Hypoxic-Ischemic Injury in the Immature Brain-Key Vascular and Cellular Players. *Neonatology*. 92. 227-235.
- Bogacz J, Chouza C, Romero S, Bogacz A, Correa H, Barbeau A. (1984). Visual evoked potentials and brain stem auditory potentials in Friedreich's ataxia--a longitudinal study. *Can J Neurol Sci*. 11.565-9.
- Caplan LR.(2000). Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*. 28. 55(10)-1596.
- Carlioni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. (2008). Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J. Pineal Res* .44. 157-164.

- Cetinkaya M, Alkan T, Ozyener F, Kafa IM, Kurt MA, Koksall N. (2011). Possible neuroprotective effects of magnesium sulfate and melatonin as both pre- and post-treatment in a neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Neonatology*. 99. 302-10.
- Chen Y, Nie H, Tian L, Tong L, Yang L, Lao N, Dong H, Sang H, Xiong L. (2013). Nicotine-induced neuroprotection against ischemic injury involves activation of endocannabinoid system in rats. *Neurochem. Res*. 38. 364-370.
- Freeman DT. (1991). Computer recognition of brain stem auditory evoked potential wave V by a neural network. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care*. 305-309.
- Goñi-de-Cerio F, Alvarez A, Caballero A, Mielgo VE, Alvarez FJ, Rey-Santano MC, Gastiasoro E, Vallsi-Soler A, Bilbao J, Hilario E. (2007). Early cell death in the brain of fetal preterm lambs after hypoxic-ischemic injury. *Brain Res*. 2.161-71.
- Hecox KE, Cone B (1981). Prognostic importance of brainstem auditory evoked responses after asphyxia. *Neurology*. 31. 1429-1434.
- Hepper PG, Shahidullah BS.(1994). Development of fetal hearing. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 71. F81–F87.
- Hilario E, Rey-Santano MC, Goñi-de-Cerio F, Alvarez FJ, Gastiasoro E, Mielgo VE, Caballero A, Valls-i-Soler A, Gómez-Urquijo S, Alvarez A. (2005). Cerebral blood flow and morphological changes after hypoxic-ischaemic injury in preterm lambs. *Acta Paediatr*. 94. 903-11.
- Hilario E, Alvarez A, Alvarez FJ, Gastiasoro E, Valls-i-Soler A.(2006). Cellular Mechanisms in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Current Pediatric Rev*. 2. 131-141.
- Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK. (2001).Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*.69, 1057-65.
- Inder TE, Volpe JJ.(2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*.5. 3-16.
- Jiang ZD, Liu XY, Shi BP, Lin L, Bu CF, Wilkinson AR. (2008). Brainstem auditory outcomes and correlation with neurodevelopment after perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol*. 39. 189-195.
- Jiang ZD, Wu YY, Wilkinson AR. (2009). Age-related changes in BAER at different click rates from neonates to adults. *Acta Paediatr* .98. 1284-1287.
- Johnston MV.(1998). Selective vulnerability in the neonatal brain. *Ann Neurol*. 44. 155-156.
- (2001). Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 7. 229-234.
- Mazurek B, Haupt H, Georgiewa P, Klapp B, Reissbauer A. (2006). A model of peripherally developing hearing loss and tinnitus based on the role of hypoxia and ischemia. *Medical Hypotheses*. 67. 892–899.
- McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J. Biol. Chem*. 281. 24171-24181.
- Moosmann B, Behl C. (2002). Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 11. 1407-1435.
- Moreno-Aguirre AJ, Santiago-Rodríguez E, Harmony T, and Fernández-Bouzas A.(2012). Effect of Hearing Aids on Auditory Function in Infants with Perinatal Brain Injury and Severe Hearing Loss. *PLoS One*.7.4100.
- Pan HC, Kao TK, Ou YC, Yang DY, Yen YJ, Wang CC, Chuang YH, Liao SL, Raung SL, Wu CW, Chiang AN, Chen CJ. (2009). Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem*. 20. 715-25.
- Plourde G.(2006). Auditory evoked potentials. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 20. 129–139.
- Revuelta R, Alvarez A, Arteaga O, Montalvo H, Alonso-Alconada D, Cañavate ML, Hilario E, Martínez-Ibargüen A. (2014).Correlation between auditory threshold and the auditory brainstem response (ABR) in rats. A possibility for the experimental study of the auditory impairments. *Microscopy: advances in scientific research and educationA. Méndez-Vilas (Ed.)*. 1. 311-317.
- Simpson GV, Knight RT, Brailowsky S, Prospero-Garcia O, Scabini D.(1985). Altered peripheral and brainstem auditory function in aged rats. *Brain Res*. 1.28-35.

Tomimatsu T, Fukuda H, Endoh M, Mu J, Kanagawa T, Hosono T, Kanzaki T, Doi K, Kubo T, Murata Y.(2003). Long-term neuroprotective effects of hypothermia on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats, assessed by auditory brainstem response. *Pediatr. Res.*53. 57-61.

Volpe JJ.(1995). Hypoxic-ischemic encephalopathy: Clinical aspects. *Neurology of the Newborn.* 314-369.

West T, Atzeva M, Holtzman DM. (2007). Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.*29. 363-372.

Wilkinson AR, Jiang ZD. (2006) Brainstem auditory evoked response in neonatal neurology. *Semin Fetal Neonatal Med.* 6. 444-451.

6. Eskerrak

Lan honen egileek Eusko Jaurlaritzaren (IT-773-13) laguntza jaso dute.

Lan hau beste lan batetik eratorria da (liburu kapitulua). (Revuelta, 2014)