

Concentraciones de Oxígeno Intermitentes tienen Impacto en el Desarrollo Postnatal Temprano de Ratas Sprague-Dawley: Efectos en CA1 del Hipocampo

Intermittent Oxygen Concentrations have an Impact on the Early Postnatal Development of Sprague-Dawley Rats: Effects on Hippocampal CA1

Mario Órdenes S.¹; German Espinoza R.¹; Benjamín Henríquez M.¹; Thomas Cabezas B.¹; Hugo Tapia G.¹; Wendy Donoso T.² & Héctor González C.¹

ÓRDENES, S. M.; ESPINOZA, R. G.; HENRÍQUEZ, M. B.; CABEZAS B. T.; TAPIA, G. H.; DONOSO, T. W.; GONZÁLEZ, C. H. Concentraciones de oxígeno intermitentes tienen impacto en el desarrollo postnatal temprano de ratas Sprague-Dawley: efectos en CA1 del hipocampo. *Int. J. Morphol.*, 41(1):59-64, 2023.

RESUMEN: El periodo postnatal temprano se caracteriza por rápido crecimiento cerebral, posiblemente relacionado con variaciones del oxígeno tisular. Esto ha motivado el estudio de protocolos que suministran diferentes concentraciones de oxígeno intermitentes, para observar sus efectos morfológicos y cerebrales. Se utilizaron 52 crías de ratas Sprague Dawley, distribuidas en igual número a cuatro grupos experimentales, Control (C, 21 %O₂), Hipoxia Intermitente (HI, 11 %O₂), Hiperoxia Intermitente (HOI, 30 %O₂) e Hipoxia Hiperoxia Intermitente (HHI, 11 % -30 %O₂). Los protocolos consideraron 5 ciclos de 5 minutos de dosificación, durante 50 minutos diarios. Se realizó en una cámara semihermética entre los días 5 al 11 postnatales. Las evaluaciones de crecimiento corporal y cuantificación neuronal, se realizaron en las crías macho, en el día 28 postnatal. El peso corporal en el grupo hipoxia intermitente mostró diferencias significativas respecto al grupo hiperoxia intermitente (HI vs HOI, p<0,01) y al grupo hipoxia-hiperoxia Intermitente (HI vs HHI, p<0,001). La talla corporal disminuyó en el grupo hipoxia-hiperoxia intermitente con diferencias significativas respecto del grupo control (C vs HHI, p<0,05) y respecto del grupo hipoxia intermitente (HHI vs HI, p<0,01). El conteo neuronal en el área CA1 del hipocampo aumentó en el grupo hipoxia intermitente con diferencias significativas respecto a los grupos control (C vs HI; p<0,05), al grupo hiperoxia intermitente (HI vs HOI; p<0,001) y al grupo hipoxia-hiperoxia intermitente (HI vs HHI; p<0,001). Finalmente, el grupo hipoxia-hiperoxia Intermitente disminuyó significativamente en la cantidad de neuronas en comparación al grupo hiperoxia intermitente (HHI vs HOI; p<0,001). La hipoxia intermitente mostró resultados beneficiosos en el crecimiento corporal y cantidad de neuronas en el área CA1 del hipocampo, en contraste, la hipoxia hiperoxia intermitente experimentó resultados adversos con disminución de estas variables, en el periodo postnatal temprano de la rata.

PALABRAS CLAVE: Oxígeno; Hipoxia; Terapéutica; Región CA1 del hipocampo.

INTRODUCCIÓN

El periodo postnatal temprano es una etapa de crecimiento cerebral rápido caracterizado por activa proliferación celular y vulnerabilidad frente a desordenes de oxigenación neonatal (Semple *et al.*, 2013). La regulación de bajas concentraciones de oxígeno tisular “hipoxia fisiológica”, es importante en estos procesos tempranos del desarrollo cerebral, para mantener la viabilidad celular (Zhang *et al.*, 2011), regular la actividad metabólica y aumentar la proliferación de células troncales neurales en el hipocampo (Panchision, 2009). Esto ha motivado la investigación de

protocolos que suministran oxígeno intermitente en diferentes concentraciones con fines terapéuticos, permitiendo observar efectos cognitivos beneficiosos que son dependientes de la dosificación (Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014), del tiempo de exposición aguda o crónica (Farahani *et al.*, 2008) y de sectores sensible a hipoxia, particularmente el área CA1 del hipocampo (Dunn *et al.*, 1999).

Los efectos de protocolos intermitentes de oxígeno comienzan a ser comprendidos, existiendo aún escasa in-

¹ Departamento de Kinesiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

² Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología, Universidad de Talca, Talca, Chile.

investigación en el periodo postnatal temprano. Al respecto, la Hipoxia Intermitente (HI) (Bousslama *et al.*, 2015) aplicando un protocolo de HI 8 %O₂ entre los días postnatales P6-P10, observó incrementó de la angiogénesis y neurogénesis en el hipocampo, junto con mejorar la memoria espacial en roedores. Estos efectos de HI tendrían estrecha relación con la expresión Hif-1 α , en condiciones de hipobaría (Zangh *et al.*, 2011). Por su parte, la Hiperoxia Intermitente (HOI) ha reportado efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo (Bigdeli *et al.*, 2009). En pruebas de memoria espacial con HOI (Koo *et al.*, 2007) observaron mayor permanencia en el cuadrante de la plataforma en Laberinto de Agua de Morris, efecto que es dependiente de la dosificación. Finalmente, en Hipoxia Hiperoxia Intermitente (HHI), (Morken *et al.*, 2013) aplicando concentraciones de hiperoxia continuas 50 %O₂ de 6 horas interrumpidas con rampas de hipoxia 12 %O₂ de 10 minutos, entre los días postnatales P0 a P14, observaron reducción del peso corporal y volumen cerebral relacionado con el tamaño de la camada, e incremento de la densidad capilar en la corteza cerebral en P14. De manera similar (Gonchar & Mankovskaya, 2009) utilizaron 5 ciclos de 5 minutos con 10 %O₂ alternado por hiperoxia 30 %O₂ diarios durante 2 semanas, observando aumento de la enzima Mn-SOD, que reduce la intensidad del proceso oxidativo mitocondrial. Estos beneficios contrastan con resultados adversos reportados en la literatura (Almendros *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2019) y la necesidad de implementar tempranamente estos protocolos intermitentes en patologías pediátricas neurológicas. Por lo anteriormente expuesto, el propósito de la presente investigación es evaluar los efectos de los protocolos de hipoxia, hiperoxia, y de hipoxia hiperoxia intermitentes, sobre el crecimiento corporal y citoarquitectura hipocampal, en el periodo postnatal temprano de ratas Sprague-Dawley.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales. Se cruzaron 5 hembras de la cepa Sprague Dawley en el bioterio de la Universidad de Talca. En el segundo día postnatal, 52 crías se distribuyeron al azar en 4 grupos experimentales, manteniendo 7 machos cada uno (Tabla I). Así, los grupos quedaron conformados de la manera siguiente: Grupo Control, C (n=13), las crías fueron mantenidas en cámara semihermética con aire ambiental por 50 min; Grupo Hipoxia Intermitente, HI (n=13) las crías fueron expuestas a cinco ciclos de hipoxia 11 %O₂, de 5 min cada ciclo, intercalados con ciclos de normoxia 21 %O₂, durante 50 min; Grupo Hiperoxia Intermitente, HOI (n=13) las ratas recibieron 5 ciclos de hiperoxia 30 %O₂ de 5 min, Intercalados con ciclos de normoxia 21 %O₂, por 50 min, y Grupo

Hipoxia-Hiperoxia Intermitente, HHI (n=13) que recibieron 5 ciclos hipoxia 11 %O₂ de 5 min, intercalados con 5 ciclos de hiperoxia 30 %O₂ de 5 min, durante 50 min. Los protocolos intermitentes (adaptados de Gonchar & Mankovskaya, 2009), fueron aplicados los días 5 a 11 postnatales de la rata. Brevemente, las crías fueron separadas de su madre para ser ubicadas en la cámara semihermética que se encontraba conectada a oxígeno y nitrógeno, según el protocolo a recibir (Adaptado de Dylag *et al.*, 2017). Válvulas solenoides permitieron el corte rápido de gases mediante un Controlador Lógico Programable (PLC) el cual reguló el tiempo de flujo de gases hasta alcanzar las concentraciones de los diferentes protocolos intermitentes. La cuantificación de oxígeno dentro de la cámara fue realizada mediante un analizador de concentración de oxígeno ambiental Niusiwen, modelo CY-12C y analizador multiparámetros Hach, modelo HQ30D. La temperatura interna de la cámara se mantuvo mediante dos placas calefactoras externas de 40 W cada una. Estas medidas permitieron reducir el estrés y minimizar la manipulación de las ratas. Posteriormente, las crías fueron mantenidas con su madre en condiciones ambientales controladas de temperatura (22 \pm 3 °C), ciclo día/noche de 12/12 horas, alimentación y agua *ad-libitum*, hasta el día postnatal 28 en que se procedió a la eutanasia. El protocolo de experimentación y sacrificio de los animales en el presente trabajo fue aprobado por el CIECUAL-UTALCA, certificado de aprobación folio N° 08-2019.

El tejido cerebral fue perfundido primero con suero fisiológico y luego con formaldehído 4 % tamponado. Posteriormente, el cerebro se extrajo del cráneo y se depositó en un recipiente hermético con formaldehído 4 % tamponado, para su fijación. Los cerebros fueron deshidratados, aclarados e incluidos en parafina histológica, para formar bloques de corte. Los cortes histológicos fueron realizados con un micrótopo rotatorio Microm HM325 a un grosor de 5 μ m. Los tejidos fueron teñidos con tinción de Nissl, (violeta de cresilo 0,5 %). Las muestras teñidas fueron deshidratadas, aclaradas y montadas con un cubreobjetos embebido en medio de montaje Consul-Mount (Thermo Fisher Scientific).

La cuantificación neuronal se realizó de acuerdo al método disector óptico (Sterio, 1984). Se seleccionan tres cerebros por grupo, obteniendo 4 cortes por hemisferio, obteniendo 12 imágenes por hemisferio y 24 mediciones de ambos hemisferios cerebrales. La identificación anatómica se realizó mediante el Atlas Cerebral de Paxinos, entre Bregma -2.30 mm y -4.80 mm. Se identificó el área del *Cornu ammonis* - Cuerno de Amón 1 (CA1) del hipocampo en un corte coronal. Se utilizó el microscopio Leica DM1000 con cámara incorporada para capturar imágenes del tejido cerebral. El programa M Shot System de Leica permitió obtener

micrografías digitales y mediante barra de calibración se estableció una línea de referencia de 25µm. Mediante el programa ImageJ se generó un recuadro de medición de dimensiones 50x50 µm. Una vez delimitada la superficie de medición, se procedió a contabilizar las neuronas de acuerdo a la regla de inclusión de somas de los márgenes derecho y superior (modificada según disposición del tejido). Los somas neuronales deben cumplir los siguientes criterios: soma de aspecto piramidal, presencia de un núcleo (West & Gundersen, 1990).

El análisis estadístico los datos fueron representados mediante su promedio y desviación estándar. A continuación, se aplicó Análisis de Varianza, ANOVA de una vía y realizó comparación múltiple mediante el test de Tukey. Se consideró significativo, $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los datos iniciales de los diferentes grupos experimentales obtenidos en el día postnatal 4, se presentan en la Tabla I. Las variables sexo, peso, talla, temperatura y frecuencia respiratoria no registraron diferencias significativas (N.S.).

Los resultados de desarrollo corporal y cuantificación neuronal en CA1 del hipocampo fueron realizadas en 7 crías macho en el día postnatal 28, y se presentan en las Figuras 1, 2 y 3.

El peso corporal (Fig. 1) en el grupo hipoxia intermite presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo hiperoxia intermitente (HI vs HOI; a, $p < 0,01$) y con el grupo hipoxia-hiperoxia intermitente (HI vs HHI; b, $p < 0,001$), los cuales tuvieron menor peso corporal.

La talla corporal (Fig. 2) disminuyó en el grupo Hipoxia-Hiperoxia intermitente presentando diferencias significativas con el grupo Control (C vs HHI; a, $p < 0,05$) y con el grupo Hipoxia Intermitente (HHI vs HI; b, $p < 0,01$).

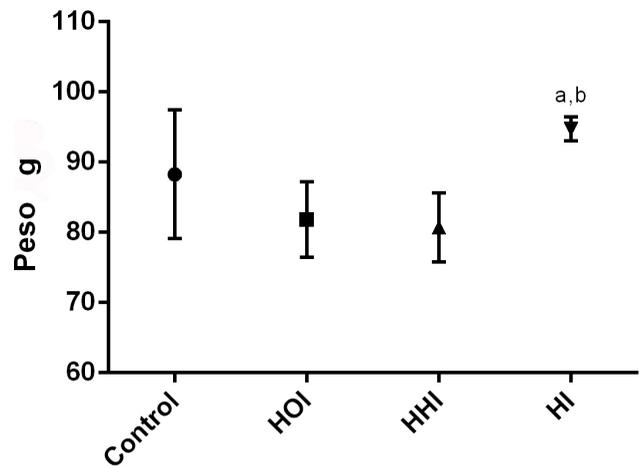


Fig. 1. Peso corporal de los grupos experimentales evaluado el día 28 postnatal. Grupo Control (l); HOI (n): Grupo Hiperoxia Intermitente; HHI (s): Grupo Hipoxia-Hiperoxia Intermitente; HI (t): Grupo Hipoxia Intermitente. Se observan diferencias estadísticas significativas entre los Grupos HOI vs HI (a, $p < 0,01$); y entre los Grupos HHI vs HI (b, $p < 0,001$).

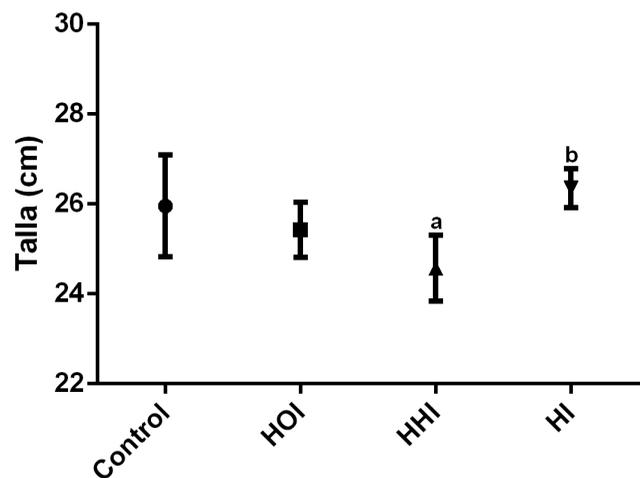


Fig. 2. Talla corporal de los grupos experimentales evaluada el día 28 postnatal. Grupo Control (l); Grupo HOI (n): Grupo Hiperoxia Intermitente; Grupo HHI (s): Grupo Hipoxia-Hiperoxia Intermitente; Grupo HI (t): Grupo Hipoxia intermitente. Se observan diferencias estadísticas significativas entre los Grupos Control vs HHI (a, $p < 0,05$); y, entre los Grupos HHI vs HI (b, $p < 0,01$).

Tabla I. Datos iniciales de grupos experimentales obtenidos el día P4, en ratas Sprague Dawley (PROM±DE).

Grupos	C n=13	HI n=13	HOI n=13	HHI n=13	Valor p
Sexo macho/hembra	7/6	7/6	7/6	7/6	N.S
Peso (gr)	11,57±2,23	12,01±1,15	11,29±1,38	12,43±0,98	$p < 0,524$
Talla (cm)	9,41±0,63	8,86±0,36	9,24±0,24	9,04±0,32	$p < 0,098$
Temperatura (°C)	36,36±0,44	36,4±0,14	36,36±0,15	36,63±0,21	$p < 0,197$
FR (r/min)	127,29±15,77	136,29±10,93	121,71±7,11	134,57±15,73	$p < 0,155$

C: Grupo Control; HI: Grupo Hipoxia Intermitente; HOI: Grupo Hiperoxia Intermitente; HHI: Grupo Hipoxia-Hiperoxia Intermitente. FR: Frecuencia respiratoria.

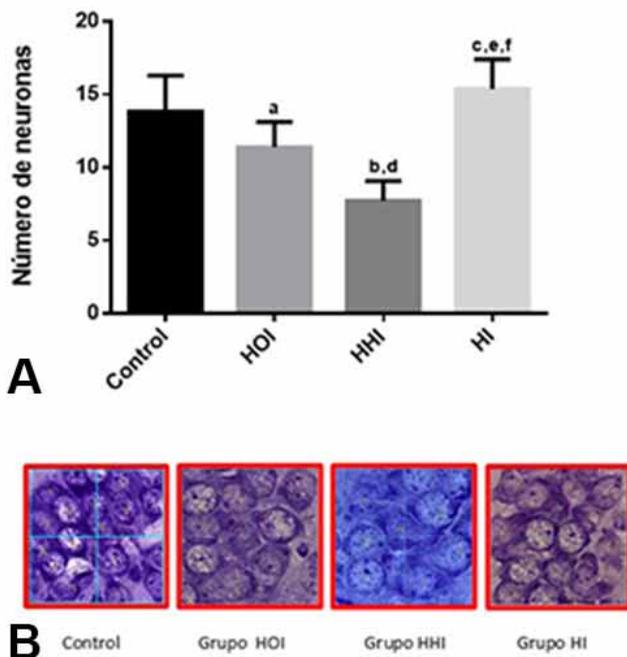


Fig. 3. Cuantificación neuronal en el área CA1 del hipocampo. A. Gráfico que representa el número de neuronas (promedio neuronal/μm²) en sujetos expuestos a protocolos intermitentes de oxígeno, evaluadas el día postnatal 28. B. Microfotografías representativas de los grupos Control, HOI, HHI y HI, del área CA1 del Hipocampo. La cuadrícula representa un área de 2500 μm². Se observan diferencias significativas entre Grupos Control vs HOI (a, p<0,001); entre Grupos Control vs HHI (b, p<0,001); entre grupos Control vs HI (c, p<0,05); entre Grupos HHI vs HOI (d, p<0,001); entre Grupos HI vs HOI (e, p<0,001); y, entre Grupos HI vs HHI (f, p<0,001).

La cuantificación neuronal en el área CA1 del hipocampo se realizó en ambos hemisferios cerebrales, no obteniendo diferencias significativas atribuibles al hemisferio (N.S.). Los datos analizados en conjunto (Fig. 3) permitieron observar disminución significativa en el número de neuronas en el grupo hiperoxia intermitente con el grupo control (C vs HOI; a, p<0,001) y en el grupo hipoxia-hiperoxia intermitente con el grupo control (C vs HHI; b, p<0,001). Por su parte, el grupo hipoxia intermitente experimentó aumento significativo en la cantidad de neuronas respecto al grupo control (C vs HI; c, p<0,05), con diferencias significativas con el grupo hiperoxia intermitente (HI vs HOI; e, p<0,001) y con grupo hipoxia-hiperoxia intermitente (HI vs HHI; f, p<0,001). Finalmente, el grupo hipoxia-hiperoxia intermitente tuvo significativamente menor cantidad de neuronas en comparación al grupo hiperoxia intermitente (HHI vs HOI; d, p<0,001).

DISCUSIÓN

La presente investigación proporciona información relevante sobre el crecimiento corporal y citoarquitectura del área CA1 del hipocampo, con diferencias importantes entre protocolos de hipoxia o hiperoxia intermitentes, en el periodo postnatal temprano de ratas.

Los pesos corporales de las crías expuestas a hipoxia intermitente mostraron diferencias significativas con respecto a la exposición a hiperoxia intermitente e hipoxia hiperoxia intermitente. En efecto, tanto en hipoxia (Farahani *et al.*, 2008) como hiperoxia (Kang *et al.*, 2019) se reportan reducciones del peso corporal. En las crías con Hipoxia Intermitente si bien se ha observado reducción de peso corporal (Row *et al.*, 2002), este efecto fue minimizado en el presente estudio debido a la dosificación de hipoxia 11 % O₂, en 5 ciclos de 5 min durante 50 min. Al respecto, Wang *et al.* (2018), estudiando bajas frecuencias de hipoxia intermitente, observaron aumento de adipogénesis subcutánea, manteniendo el peso corporal similar al presente estudio. Por otra parte, la administración de hipoxia-hiperoxia intermitente provocó menor crecimiento corporal de las crías. Esta reducción en el crecimiento corporal ha sido estudiada (Morken *et al.*, 2013), y lo relaciona con la cantidad de sujetos por camada, trece sujetos al igual que el presente estudio.

La citoarquitectura de la región CA1 del hipocampo experimentó reducción importante en la cantidad de neuronas en los grupos Hiperoxia Intermitente e Hipoxia-Hiperoxia Intermitente. En efecto, dosis altas de hiperoxia continua recibidas entre los días postnatal P1 a P14, resultan en aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) cerebral y de células apoptóticas en el hipocampo, que se observa tempranamente (Kang *et al.* 2019). Estos efectos de la hiperoxia cerebral son atribuidos al aumento de ROS, que disminuye la enzima desacetilasa de Histona Sirt1, con lo cual aumenta la acetilación de p53, que induce apoptosis neuronal en el hipocampo. Por su parte, la menor cantidad de neuronas en hipoxia-hiperoxia intermitente es resultado del proceso adaptativo cerebral bifásico, en fase de hipoxia aumenta la densidad capilar cerebral, mientras que en fase de hiperoxia las enzimas antioxidantes deben reducir el estrés oxidativo (Bigdeli *et al.*, 2009) y los vasos neoformados experimentan obliteración, impactando el desarrollo celular del hipocampo (Morken *et al.*, 2013).

La hipoxia intermitente de acuerdo con el presente estudio aumentó la cantidad de neuronas en CA1, del hipocampo. Al respecto Pourié *et al.* (2006) expusieron

crías recién nacidas a un pulso de hipoxia 100 % N₂ breve de 5 min, observando que no ocasiona apoptosis, por el contrario, aumentó la densidad neuronal y la neurogénesis en CA1 en ratas el día 20 postnatal. Estos efectos se mantuvieron hasta la senescencia P720 (Martin *et al.*, 2012), con aumento de proteínas sinapsinas fosforiladas, incremento en la asociación de la proteína PSD-95 y receptores NMDA, además de aumento de células GABAérgicas, con efectos que favorecen la plasticidad sináptica y rendimiento observado en la memoria espacial en el Laberinto en T. Los efectos neuroprotectores de protocolos de hipoxia intermitente (Farahani *et al.*, 2008; Bouslama *et al.*, 2015) pudieran involucrar reducción de la apoptosis mediada por factores de crecimiento (Goldbart *et al.*, 2003), que vía AKT rescata las neuronas de apoptosis en el área CA1 del hipocampo, que son dependiente del tiempo y dosificación. Estudiar los mecanismos de apoptosis y sinaptogénesis en corto y largo plazo, permitiría proyectar la importancia terapéutica de estos protocolos.

Podemos concluir que la hipoxia intermitente tuvo efectos beneficiosos sobre el crecimiento corporal y citoarquitectura de CA1 del hipocampo. La hiperoxia intermitente disminuyó la cantidad de neuronas en CA1. Finalmente, la hipoxia hiperoxia intermitente disminuyó el crecimiento corporal y la cantidad de neuronas en CA1, relacionada con los efectos estresantes bifásicos de la hipoxia y la hiperoxia intermitentes.

ÓRDENES, S. M.; ESPINOZA, R. G.; HENRÍQUEZ, M. B.; CABEZAS B. T.; TAPIA, G. H.; DONOSO, T. W.; GONZÁLEZ, C. H. Intermittent oxygen concentrations have an impact on the early postnatal development of Sprague-Dawley rats: Effects on hippocampal CA1. *Int. J. Morphol.*, 41(1):59-64, 2023.

SUMMARY: The early postnatal period is characterized by rapid brain growth, possibly related to variations in tissue oxygen. This has motivated the study of protocols that supply different intermittent oxygen concentrations, to observe their morphological and cerebral effects. Fifty-two pups Sprague-Dawley rats were distributed in equal numbers into four experimental groups, Control (C, 21 % O₂), Intermittent Hypoxia (HI, 11 % O₂), Intermittent Hyperoxia (HOI, 30 % O₂) and Intermittent Hypoxia Hyperoxia (HHI, 11 % - 30 % O₂). The protocols considered 5 cycles of 5 min of dosing, for 50 min diary. It was performed in a semi-hermetic chamber between 5 to 11 postnatal days. The evaluations of body growth and neuronal quantification were analyzed in male pups, on postnatal day 28. Body weight in the intermittent hypoxia group showed significant differences compared to the intermittent hyperoxia group (HI vs HOI, p<0.01) and the intermittent hypoxia-hyperoxia group (HI vs HHI, p<0.001). Body size decreased in the Intermittent hypoxia-hyperoxia group with significant differences compared to the control group (C vs HHI, p<0.05) and with respect to the intermittent hypoxia group (HHI vs HI, p<0.01). The neuronal

count in the area CA1 of the hippocampus increased in the intermittent hypoxia group with significant differences compared to the control groups (C vs HI; p<0.05), to the intermittent hyperoxia group (HI vs HOI; p<0.001) and the intermittent hypoxia-hyperoxia group (HI vs HHI; p<0.001). Finally, the intermittent hypoxia-hyperoxia group decreased significantly in the number of neurons compared with the intermittent hyperoxia group (HHI vs HOI; p<0.001). Intermittent hypoxia showed beneficial results in body growth and the number of neurons in the CA1 area of the hippocampus, in contrast, intermittent hypoxia-hyperoxia experienced adverse results with a decrease in these variables, in the early postnatal period of the rat.

KEY WORDS: Oxygen; Hypoxia; Therapeutics; CA1 Region Hippocampal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Almendros, I.; Wang, Y. & Gozal, D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 307(2):L129-40, 2014.
- Bigdeli, M.; Rasouljan, B. & Meratan, A. In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. *Eur. J. Pharmacol.*, 611(1-3):22-9, 2009.
- Bouslama, M.; Adla-Biassette, H.; Ramanantsoa, N.; Bourgeois, T.; Bollen, B.; Brissaud, O.; Matrot, B.; Gressens, P. & Gallego, J. Protective effects of intermittent hypoxia on brain and memory in a mouse model of apnea of prematurity. *Front. Physiol.*, 6:313, 2015.
- Dunn, J.; Wadghiri, Y. & Meyerand, M. Regional heterogeneity in the brain's response to hypoxia measured using BOLD MR imaging. *Magn. Reson. Med.*, 41(4):850-4, 1999.
- Dylag, A.; Mayer, C.; Raffay, T.; Martin, R.; Jafri, A. & MacFarlane, P. Long-term effects of recurrent intermittent hypoxia and hyperoxia on respiratory system mechanics in neonatal mice. *Pediatr. Res.*, 81(4):565-71, 2017.
- Farahani, R.; Kanaan, A.; Gavrialov, O.; Brunnert, S.; Douglas, R.; Morcillo, P. & Haddad, G. Differential effects of chronic intermittent and chronic constant hypoxia on postnatal growth and development. *Pediatr. Pulmonol.*, 43(1):20-8, 2008.
- Goldbart, A.; Cheng, Z.; Brittan, K. & Gozal, D. Intermittent hypoxia induces time-dependent changes in the protein kinase B signaling pathway in the hippocampal CA1 region of the rat. *Neurobiol. Dis.*, 14(3):440-6, 2003.
- Gonchar, O. & Mankovskaya, I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. *Acta Biol. Hung.*, 60(2):185-94, 2009.
- Kang, L.; Dong, W.; Ruan, Y.; Zhang, R. & Wang, X. The molecular mechanism of Sirt1 signaling pathway in brain injury of newborn rats exposed to hyperoxia. *Biol. Pharm. Bull.*, 42(11):1854-60, 2019.
- Koo, S.; Kim, C.; Ahn, H.; Kim D.; Kim, K. & Kim, C. Effects of long-term intermittent oxygen administration of the cognitive function in rat. *Korean J. Anesthesiol.*, 52(6):687-93, 2007.
- Martin, N.; Bossenmeyer-Pouricé, C.; Koziel, V.; Jazi, R.; Audonnet, S.; Vert, P.; Guéant, J.; Daval, J. & Pouricé, G. Non-injurious neonatal hypoxia confers resistance to brain senescence in aged male rats. *PLoS One*, 7(11):e48828, 2012.
- Morken, T.; Nyman, A.; Sandvig, I.; Torp, S.; Skranes, J.; Goa, P.; Brubakk, A. & Widerøe, M. Brain development after neonatal intermittent hyperoxia-hypoxia in the rat studied by longitudinal MRI and immunohistochemistry. *PLoS One*, 8(12):e84109, 2013.

- Navarrete-Opazo, A. & Mitchell, G. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 307(10):R1181-97, 2014.
- Panchision, D. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J. Cell Physiol.*, 220(3):562-8, 2009.
- Pourié, G.; Blaise, S.; Trabalon, M.; Nédélec, E.; Guéant, J. & Daval, J. Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores. *Neuroscience*, 140(4):1369-79, 2006.
- Row, B.; Kheirandish, L.; Neville, J. & Gozal, D. Impaired spatial learning and hyperactivity in developing rats exposed to intermittent hypoxia. *Pediatr. Res.*, 52(3):449-53, 2002.
- Semple, B.; Blomgren, K.; Gimlin, K.; Ferriero, D. & Noble-Haesslein, L. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.*, 106-107:1-16, 2013.
- Sterio, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.*, 134(Pt. 2):127-36, 1984.
- Wang, Y; Mak, J.; Lee, M.; Xu A. & Ip, M. Low-frequency intermittent hypoxia promotes subcutaneous adipogenic differentiation. *Oxidative Med. Cel. Longevity*, 2018:4501757, 2018.
- West, M. & Gundersen, H. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 296(1):1-22, 1990.
- Zhang, K.; Zhu, L. & Fan, M. Oxygen, a key factor regulating cell behavior during neurogenesis and cerebral diseases. *Front. Mol. Neurosci.*, 4:5, 2011.

Dirección para correspondencia:

Héctor González Caro
San Miguel 3605
Universidad Católica del Maule
Talca
CHILE

E-mail: hgonzale@ucm.cl