
Trabajo Fin de Grado
Grado en Medicina

**Estrategias neuroprotectoras frente a la
encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal**

Autora:

Beatriz Zorrilla Fernández

Director:

Daniel Alonso Alconada

© 2023, Beatriz Zorrilla Fernández

Leioa, 19 de abril de 2023

ÍNDICE

Resumen.....	ii
1. Introducción.....	1
1.1. Definición y epidemiología.....	1
1.2. Fisiopatología.....	1
1.3. Diagnóstico y clasificación.....	2
2. Objetivo.....	3
3. Material y métodos.....	4
4. Resultados	6
5. Discusión.....	8
5.1. Hipotermia terapéutica.....	8
5.2. Terapias emergentes en fase clínica.....	10
5.2.1. Melatonina.....	10
5.2.2. Eritropoyetina.....	11
5.2.3. Cannabidiol.....	14
5.2.4. Alopurinol.....	15
5.2.5. N-acetilcisteína.....	17
5.2.6. Células madre mesenquimales.....	18
5.2.7. Xenón.....	20
5.2.8. Topiramato.....	22
5.2.9. Sulfato de magnesio.....	24
5.2.10. 2-Iminobiotin.....	25
5.3. Terapias emergentes en fase preclínica.....	26
5.3.1. Memantina.....	26
5.3.2. Exenatida.....	27
5.3.3. Edaravona.....	29
5.3.4. 17β-Estradiol.....	29
5.3.5. Hidrógeno y argón.....	30
5.3.6. Dexmedetomidina.....	31
6. Conclusiones.....	33
7. Bibliografía.....	35
Anexo I.....	55

RESUMEN

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) neonatal, ocasionada como consecuencia de la privación de oxígeno cerebral, es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos. Manteniendo una incidencia que oscila entre 1-8 por 1000 recién nacidos vivos en países desarrollados y de hasta 25 por 1000 recién nacidos vivos en países en vías de desarrollo, ocasiona trastornos graves del desarrollo neurológico, siendo un problema médico que afecta significativamente al paciente, la familia y la sociedad. Por este motivo, la prevención y el tratamiento de esta enfermedad es un objetivo prioritario.

Actualmente, el estándar de atención implementado en la práctica clínica es la hipotermia terapéutica (HT). A pesar de ser una terapia efectiva y beneficiosa, se mantiene limitada por estrictos requisitos necesarios para implementarla y por la cantidad de complicaciones severas que aún siguen mostrando los recién nacidos con EHI moderada o grave pese al tratamiento.

A la necesidad de explorar terapias alternativas o complementarias para mejorar los resultados y el pronóstico de los recién nacidos con EHI responde esta revisión, comparando las diferentes herramientas terapéuticas que están en proceso de desarrollo.

Este trabajo se ha centrado, por un lado, en terapias con potencial terapéutico demostrado y que disponen de ensayos clínicos en curso, tales como la melatonina, la eritropoyetina, el cannabidiol, el alopurinol, la N-acetilcisteína, las células madre mesenquimales, el xénon, el topiramato, el sulfato de magnesio y el 2-Iminobiotin. Por otro lado, también se ha orientado hacia terapias con estudios preclínicos publicados y que están en proceso de desarrollo como la memantina, la exenatida, el edaravona, el 17 β -estradiol, el hidrógeno, el argón y la dexmedetomidina.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de invertir en investigación para profundizar en el conocimiento de la fisiopatología del daño neuronal tras la asfixia perinatal, con el fin de hallar nuevas dianas con potencial terapéutico y para poder diseñar ensayos clínicos de mayor tamaño, con la finalidad de avanzar en la demostración de la eficacia de estas terapias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) neonatal es la disfunción neurológica que se produce como consecuencia de la interrupción del flujo sanguíneo cerebral y el subsiguiente déficit de oxígeno tisular que ocurre en el periodo periparto y/o intraparto al recién nacido. Es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos (1,2).

La incidencia oscila entre 1-8 por 1000 recién nacidos vivos en países desarrollados y de hasta 25 por 1000 recién nacidos vivos en países en vías de desarrollo, no existiendo diferencias significativas entre sexo, razas o grupos étnicos (3-5). Entre el 20-50% de los recién nacidos con EHI fallecen dentro del periodo neonatal, y hasta el 25% de los supervivientes presentarán discapacidades neuropsicológicas permanentes, que implican epilepsia, retraso mental, parálisis cerebral y problemas cognitivos, de desarrollo y del comportamiento (6,7). Por consiguiente, esta condición es un problema médico grave que afecta significativamente al paciente, la familia y la sociedad por lo que la prevención y el tratamiento de esta enfermedad sigue siendo una cuestión preferente (8).

1.2. FISIOPATOLOGÍA

La sucesión de eventos que conducen a la EHI, comienza con la primera etapa que comprende las primeras 6 horas desde el evento hipóxico-isquémico y se denomina deficiencia energética primaria. Sucede por el aumento del metabolismo anaerobio de la glucosa en las células nerviosas debido a la carencia de oxígeno cerebral. Esto desencadena un cúmulo de ácido láctico, una reducción del ATP y la consiguiente interrupción de la bomba Na^+/K^+ provocando edema y lisis celular precoz (8,9).

En los recién nacidos con EHI moderada-grave, la fase latente es seguida por la fase secundaria, también conocida como fallo energético secundario. Esta etapa discurre entre las 6-48 horas y es consecuencia de la reoxigenación y reperfusión. La recuperación parcial del metabolismo oxidativo en la fase latente desata una mayor producción de radicales de oxígeno (ROS), un aumento del daño mitocondrial,

excitotoxicidad y activación de cascadas proinflamatorias que enfatizan la apoptosis y la necrosis celular tardía (7).

Por último, la tercera etapa ocurre a partir de las 72 horas del proceso hipóxico-isquémico y puede durar desde días hasta meses. Durante esta etapa el tejido cerebral dañado puede recuperarse o continuar su degeneración produciendo daños en el crecimiento axonal, la sinaptogénesis y la neurogénesis (7,10).

Asociado al daño neurológico, el síndrome hipóxico-isquémico tiene una afectación multiorgánica. Esta afectación es causada por la redistribución sanguínea debido a la disminución del flujo sanguíneo placentario, desde la piel y órganos tales como el bazo o los riñones hacia órganos vitales como el corazón, las glándulas suprarrenales y el cerebro. La consecuente participación de múltiples sistemas orgánicos y el daño secundario al déficit de perfusión de estos, conduce al desarrollo de disfunción orgánica multisistémica (DMO) (6,11).

1.3. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

La definición de la EHI en recién nacidos propuesta por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos incluye los siguientes criterios (12):

- Puntuación de Apgar < 5 a los 5 y 10 minutos.
- Acidemia de la arteria umbilical fetal con un $\text{pH} < 7$ y/o déficit de base ≥ 12 mmol/L.
- Evidencia de lesión cerebral aguda detectada por pruebas de neuroimagen como la resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral o espectroscopia de RMN.
- Presencia de disfunción orgánica multisistémica.

La existencia de registros cardiotocográficos patológicos y de los siguientes eventos centinela durante el parto respaldan el diagnóstico de asfixia fetal: rotura uterina, prolapso del cordón umbilical, desprendimiento prematuro de la placenta, vasa previa, embolia de líquido amniótico o hemorragia fetomaterna masiva en el parto (4,12).

La escala para la estadificación de la EHI en recién nacidos propuesta por Sarnat y Sarnat, se basa en la determinación del nivel de conciencia, el tono muscular, los reflejos primitivos, la función autonómica, las convulsiones, los cambios en el electroencefalograma (EEG) y la duración para diferenciar la encefalopatía en tres formas clínicas: leve, moderada y grave (13,14).

2. OBJETIVO

El cuidado del recién nacido en riesgo de hipoxia-isquemia cerebral es una prioridad en la atención perinatal actual y para ello es esencial hallar alternativas farmacológicas basadas en la comprensión de la fisiopatología del daño cerebral hipóxico-isquémico.

Por este motivo, esta revisión tiene como objetivo analizar las estrategias farmacológicas y herramientas terapéuticas más relevantes que a día de hoy se encuentran en ensayo clínico, con o sin hipotermia, así como el potencial neuroprotector de diversos compuestos en fase de desarrollo preclínico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda sistemática acerca de las posibles estrategias terapéuticas de la EHI empleando “PubMed” como principal motor de búsqueda de artículos científicos.

El objetivo de la primera búsqueda ha sido obtener una perspectiva general a cerca de la EHI. Para ello, se han empleado los siguientes términos: “Hypoxic ischemic encephalopathy AND neonat*” limitando la búsqueda a las revisiones sistemáticas publicadas entre 2013-2022. La lectura del título ha permitido descartar aquellas revisiones fundamentadas en las pruebas pronósticas para valorar la severidad de la EHI como la RMN, el EEG o los biomarcadores de daño cerebral. De la misma manera, también se han excluido las revisiones que se basan en el potencial terapéutico de una terapia frente a la EHI. Finalmente se han conseguido seleccionar 14 artículos que se centran específicamente en la EHI incluyendo información relevante para adquirir una visión general de la definición, epidemiología, fisiopatología y clínica de esta patología. Con el objetivo de ampliar la información acerca de las diferentes herramientas terapéuticas existentes para el abordaje de la EHI, se ha procedido a realizar búsquedas adicionales.

Puesto que la HT es el tratamiento estándar actualmente implantado en las unidades neonatales de los países desarrollados, se ha decidido realizar una segunda búsqueda empleando “Neuroprotection AND hypoxic ischemic encephalopathy AND Hypothermia, Induced [Mesh]” acotando la búsqueda a artículos publicados entre 2013-2022. El objetivo de esta búsqueda es recopilar la evidencia disponible a cerca de la HT. Asimismo, tiene el fin de analizar las terapias experimentales que se estén investigando como terapias coadyuvantes a la HT excluyendo los artículos que hagan referencia a las siguientes terapias: melatonina, eritropoyetina, cannabidiol, alopurinol, N-acetilcisteína, células madre mesenquimales y xenón, puesto que van a ser desarrolladas de manera individual en una búsqueda posterior.

Por último, se han llevado a cabo 7 búsquedas independientes empleando “Hypoxic ischemic encephalopathy” con la preposición de búsqueda “AND” para combinarlo con cada uno de los siguientes términos MeSH (Medical Subject Headings): “Melatonin”, “Erythropoietin”, “Cannabidiol”, “Allopurinol”, “Acetylcysteine”,

"Mesenchymal Stem Cells" y "Xenon". La razón por la cual se han seleccionado estas herramientas terapéuticas como términos de búsqueda es por la disposición de una desarrollada investigación científica del potencial efecto terapéutico de estos tratamientos tanto en monoterapia como en combinación con la HT contra la encefalopatía neonatal tras un evento hipóxico-isquémico. Se ha limitado la búsqueda a artículos publicados entre 2013-2022 y tras la lectura del resumen de los artículos centrados en los beneficios y las limitaciones de las diversas terapias con título acorde con el objetivo de la revisión, se han seleccionado 84 artículos.

4. RESULTADOS

Para encontrar los artículos a revisar se han realizado 9 búsquedas en la base de datos “PubMed”, utilizando los términos y los procedimientos explicados en el apartado de metodología.

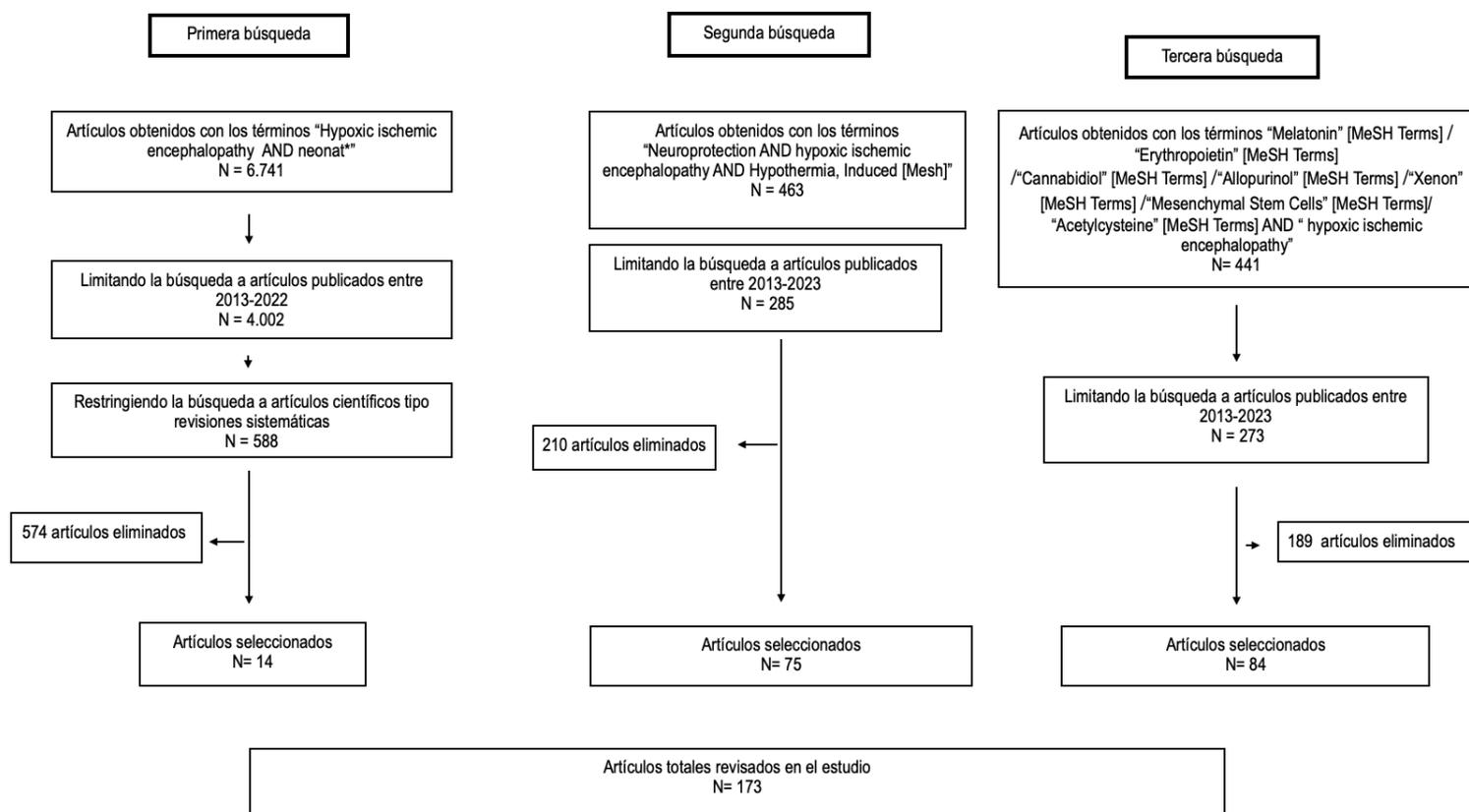
En la primera búsqueda “Hypoxic ischemic encephalopathy AND neonat*” se han conseguido 6.741 resultados. Para reducir el número de artículos se ha limitado la búsqueda a artículos publicados entre 2013-2022, obteniendo 4.002 artículos y se ha restringido a artículos científicos tipo revisiones sistemáticas alcanzando los 588. Excluyendo los artículos que se relacionan con en las herramientas terapéuticas o pronosticas se han adquirido 14 artículos.

En una segunda búsqueda empleando “Neuroprotection AND hypoxic ischemic encephalopathy AND Hypothermia, Induced [Mesh]” se han encontrado 463 resultados y tras acotar la búsqueda a artículos publicados entre 2013-2022 se han obtenido 285. Se han identificado 75 artículos que se ajustan a la terapia con HT de la EHI y aquellas terapias coadyuvantes a la HT en proceso de desarrollo, descartando los artículos que hacen referencia a las terapias con melatonina, eritropoyetina, cannabidiol, alopurinol, N-acetilcisteína, células madre mesenquimales.

Estas 7 terapias se han desarrollado en 7 búsquedas independientes empleando “Hypoxic ischemic encephalopathy” con la preposición de búsqueda “AND” para combinarlo con cada uno de los los siguientes términos MeSH (Medical Subject Headings): “Melatonin”, “Erythropoietin”, “Cannabidiol”, “Allopurinol”, “Acetylcysteine”, “Mesenchymal Stem Cells” y “Xenon” obteniéndose un total de 441 artículos. Se ha limitado la búsqueda a artículos publicados entre 2013-2022 con un resultado de 273 artículos. Finalmente se han incluido 84 artículos: 16 acerca de la melatonina, 13 sobre la eritropoyetina, 15 basándose en el cannabidiol, 9 en el alopurinol, 5 en la N-acetilcisteína, 10 en las células madre mesenquimales y 16 en el xenón.

En definitiva, 173 artículos han sido revisados. Los resultados, así como la selección de los artículos incluidos, se muestran esquematizados en el siguiente diagrama (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de flujo de la selección de artículos de la revisión bibliográfica



5. DISCUSIÓN

5.1. HIPOTERMIA TERAPÉUTICA

La hipotermia terapéutica (HT) es la estrategia de tratamiento considerada como el estándar en la atención actual de los países desarrollados (15). Los pacientes nacidos con ≥ 36 semanas de gestación con EHI moderada a grave tienen indicación de HT (16). La hipotermia reduce entre un 5% y un 8% del metabolismo cerebral por cada 1°C de disminución de la temperatura corporal, lo que retrasa el inicio de la despolarización celular anóxica (17). Por esta razón, se ha evidenciado que la hipotermia ha sido efectiva en la reducción de las secuelas neurológicas y la mortalidad, mejorando el neurodesarrollo y el pronóstico a largo plazo de los recién nacidos con EHI moderada principalmente (15,18,19).

No obstante, la eficacia de la hipotermia depende en gran medida del momento de inicio, de la profundidad y duración del enfriamiento (20). Es importante actuar antes de la fase secundaria puesto que, durante la fase de latencia, las neuronas apoptóticas todavía son capaces de recuperarse ofreciendo así una ventana terapéutica (17). De manera que, la TH debe iniciarse dentro de las 6 horas posteriores al nacimiento y continuar durante 72 horas con una temperatura central (esofágica o rectal) alrededor de 33,5 a 34,5 °C. Para conseguir una correcta actuación, es fundamental la atención de un equipo multidisciplinario y todos los pacientes tratados deben ser seguidos durante un periodo de tiempo (16). A consecuencia de estos requisitos, se estima que sólo 1 de cada 6 recién nacidos se beneficia de la HT (21).

Se ha comprobado que un enfriamiento más prolongado (> 120 horas) o más profundo no implica un efecto más relevante. Independientemente de la gravedad de la EHI, no debería de ser necesario disminuir las temperaturas centrales por debajo de 33°C ya que no se ha observado un incremento en la reducción de discapacidad o muerte asociada (22). Realmente, las temperaturas inferiores a 32°C, tienen un menor efecto neuroprotector y mayores efectos adversos graves con aumento de la mortalidad (18,23,24). El hecho de que no se hallen resultados estadísticamente significativos en los estudios que comparan a neonatos tratados con hipotermia pasadas las 6 horas del evento hipóxico-isquémico, con neonatos a los que no se les ha implementado la HT,

refuerza la necesidad de protocolos clínicos. De esta manera se podría asegurar que la HT se inicie en ese intervalo de tiempo después de la reanimación, para así tener la oportunidad de obtener un resultado favorable (25).

La hipotermia se puede inducir produciendo un enfriamiento selectivo, de la cabeza con un casco o de todo el cuerpo con un colchón térmico. No se han visto diferencias significativas en los efectos adversos, el desarrollo neuromotor o las tasas de mortalidad entre las dos modalidades, por lo que ambas estrategias parecen equivalentes. Sin embargo, el empleo del enfriamiento sistémico está más extendido puesto que es más cómodo de implementar (18, 26).

El recalentamiento debe realizarse de forma lenta y gradual durante un periodo de 4 horas, no aumentando más de 0,5 °C por hora hasta que la temperatura alcance los 36,5 °C. Esto se basa en que el recalentamiento rápido podría desestabilizar la función cardiovascular o desencadenar convulsiones de rebote (15,17).

La utilidad de la HT se limita a recién nacidos de al menos 36 semanas de edad gestacional, con una ventana terapéutica de tan sólo 6 horas y requiriendo un equipo especial y un alto nivel de apoyo de cuidados intensivos. Estas condiciones no se pueden proporcionar en países en vías de desarrollo carentes de infraestructura suficiente (27, 28). Además, se ha demostrado que la TH es ineficaz y posiblemente incluso dañina en presencia de infección neonatal extendida o hipertermia materna. (17, 18, 29)

Aun siendo la HT beneficiosa, los recién nacidos con EHI moderada o grave tratados con HT siguen padeciendo complicaciones severas como: un 28% de mortalidad, un 24% de deterioro cognitivo, un 22% de parálisis cerebral, un 19% de epilepsia, una discapacidad visual cortical del 6% o una discapacidad moderada/grave del 48%; por lo que son necesarias terapias complementarias para mejorar aún más los resultados (18,30).

5.2. TERAPIAS EMERGENTES EN FASE CLÍNICA

Ante las limitaciones de la eficacia y los inconvenientes de los protocolos de hipotermia terapéutica, las investigaciones actuales van dirigidas al desarrollo e implementación de terapias farmacológicas neuroprotectoras que puedan emplearse en combinación con la HT, para poder obtener mejoras más significativas de los resultados.

5.2.1. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina producida a partir del aminoácido triptófano, que se convierte en serotonina (31) y es secretada endógenamente por la glándula pineal según el ritmo circadiano (32). La producción de melatonina pineal no está completamente madura al nacer, por lo que se produce una deficiencia transitoria de melatonina que hace que el neonato sea más susceptible al daño oxidativo (33). Debido a su carácter lipofílico, la melatonina atraviesa libremente la barrera hematoencefálica, otorgándole acciones neuroprotectoras (34).

La melatonina, debido a su mecanismo neuroprotector multifacético, tiene el potencial de limitar el daño durante la fase latente, reducir la fase secundaria de muerte neuronal y reducir la lesión cerebral continúa observada en la fase terciaria que podría desembocar en una disminución de la plasticidad cerebral (35,36). Posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas, promoviendo el desarrollo y la supervivencia neuronal (37). Como agente antioxidante, estimula la actividad de las enzimas antioxidantes y neutraliza las especies reactivas de oxígeno (ROS) (31). Su función antiinflamatoria se debe a la reducción de la producción de citoquinas inflamatorias (38), la disminución de la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (39) y del menor reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares a las zonas inflamatorias (40). Finalmente, también tiene efecto antiapoptótico previniendo el daño mitocondrial, la muerte excitotóxica de los astrocitos y mejorando las vías de rescate celular (37).

En ensayos preclínicos con animales, se ha demostrado que es capaz de proteger el cerebro del daño hipóxico-isquémico de forma independiente (41) o junto con la HT (42). Concretamente, se ha visto que reduce el volumen de infarto cerebral, inhibe la

muerte de las células neuronales, mejora el metabolismo energético cerebral, reduce la lesión de la sustancia blanca y disminuye el déficit de aprendizaje (43).

Concretamente un estudio piloto prospectivo controlado y aleatorizado con 30 neonatos con EHI, ha demostrado la eficacia potencial de la melatonina por vía enteral cuando se administra en combinación con la HT. Se ha observado una reducción de las convulsiones en el EEG de seguimiento, menos anomalías de la sustancia blanca en la imagen de RMN y una mejoría en la supervivencia sin discapacidad neurológica o del desarrollo a los 6 meses de edad en comparación con la hipotermia como terapia única. Sin embargo, el estudio fue diseñado con un tamaño muestral pequeño y el seguimiento del neurodesarrollo se limitó a sólo 6 meses de edad (31).

La melatonina vía enteral no ha producido efectos secundarios significativos en niños (44) y recién nacidos pretérmino (45). Aun así, todavía no se ha determinado mediante ensayos clínicos la seguridad y la tolerancia de la melatonina intravenosa (10,30).

A pesar de los datos preclínicos prometedores sobre el papel de la melatonina en el tratamiento de la EHI, todavía se requieren estudios farmacocinéticos detallados en recién nacidos con EHI moderada y grave para determinar un régimen de dosificación óptimo, la vía de administración más adecuada y la duración de la administración para una óptima neuroprotección (21,30,34). Además, la melatonina es fotosensible y se degrada en cuestión de horas tras la exposición a los rayos UVA y UVB, lo que obliga a necesitar requisitos específicos de almacenamiento y administración (46).

5.2.2. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una citoquina que durante el periodo fetal es sintetizada por el hígado y que, tras el nacimiento, es sintetizada por el riñón y el cerebro en respuesta a la hipoxia aguda (47). La terapia con eritropoyetina o con la EPO recombinante humana (rhEPO), se fundamenta en su acción como factor de crecimiento y agente neuroprotector capaz de promover la neurogénesis, la oligodendrogénesis y la angiogénesis mejorando así la revascularización del cerebro isquémico (43,48,49). También tiene efectos antiinflamatorios, antiexcitotóxicos, antiapoptóticos, antioxidantes y neuroregenerativos (50-52)

Estudios de fase I/II que evalúan la seguridad y la farmacocinética de la EPO en recién nacidos han mostrado que dosis escalonadas de 1.000 U/kg producen concentraciones plasmáticas similares a las encontradas como neuroprotectoras en animales (53, 54). La monoterapia con EPO a dosis más altas (2.500 U/kg), ha demostrado una disminución en la concentración de óxido nítrico, una mejoría en el EEG y un menor riesgo de rehospitalización (55). Sin embargo, esta dosis sólo se ha probado en EHI leve-moderada, aún se necesitan más estudios para ver su seguridad en EHI grave. El tratamiento con EPO tiene la ventaja de una menor complejidad técnica, menos efectos secundarios y una mayor ventana de acción en comparación con la TH (28).

La vía utilizada para la administración de rhEPO para EHI en neonatos es subcutánea o intravenosa. Sin embargo, hay variabilidad en la dosis (desde 300 U/kg hasta 2500 U/kg), el punto de inicio (a las 4-6 horas postEHI o retrasado hasta 48 horas después del nacimiento), la frecuencia de las inyecciones (diarias o a días alternos) y la duración del tratamiento (desde 4 hasta 12 dosis) (56, 57).

Un metaanálisis reciente de ensayos clínicos controlados aleatorios para la neuroprotección con eritropoyetina en lactantes con EHI moderada-grave, sugiere que la terapia con eritropoyetina aislada tiene la capacidad de reducir el riesgo de lesión cerebral, parálisis cerebral y deterioro cognitivo en comparación con el placebo. También se ha observado un riesgo reducido de lesión cerebral identificado en la RMN y de muerte en neonatos tratados con EPO en monoterapia o como terapia complementaria de la HT (56).

Se han observado resultados neurológicos prometedores de la EPO en bebés prematuros nacidos entre las 27 y 30 semanas de gestación. Sin embargo, no hubo menor riesgo de resultados graves del desarrollo neurológico o muerte en neonatos extremadamente prematuros nacidos entre las 24 y 27 semanas de gestación. Podría ser que los efectos beneficiosos del tratamiento con EPO estén restringidos a los bebés nacidos en el tercer trimestre y a término, o que una modificación de dosis o un seguimiento más a largo plazo, modifiquen los hallazgos encontrados (57). En conformidad con estos resultados, un estudio de fase III de neuroprotección con EPO para neonatos prematuros llevado a cabo en Estados Unidos (Ensayo Preterm EPO Neuroprotection [PENUT], NCT01378273) ha concluido que el tratamiento con dosis

de 1.000 U/kg dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento y cada 48 horas para un total de 6 dosis de EPO por vía intravenosa administrado a bebés que nacieron entre las 24 semanas y las 27 semanas y 6 días de gestación, no ha resultado ofrecer un menor riesgo de deterioro grave del desarrollo neurológico o muerte a los 2 años (58).

Recientemente se ha publicado un ensayo clínico de fase III (High-dose Erythropoietin for Asphyxia and Encephalopathy [HEAL], NCT02811263), donde se han asignado 501 neonatos nacidos a partir de las 36 semanas de gestación con EHI moderada-grave para recibir EPO 1.000 U/kg vía intravenosa en combinación con HT dentro de las 26 horas después del nacimiento y a los 2,3,4 y 7 días. El objetivo del estudio ha sido valorar la incidencia de muerte y el deterioro del neurodesarrollo entre los 22 y los 36 meses de edad. Se ha llegado a la conclusión de que la terapia conjunta de EPO y HT no conlleva menor riesgo de muerte o deterioro del desarrollo que el placebo, asociándolo además con una mayor tasa de eventos adversos graves. Estos hallazgos difieren con los resultados obtenidos en los ensayos clínicos pequeños en los que se observaba que la terapia con eritropoyetina parecía segura y eficaz. Los resultados negativos del estudio podrían estar relacionados con el encubrimiento del beneficio de la EPO por el uso de la HT concomitante, la diferencia de los mecanismos de lesión entre modelos preclínicos de EHI y los humanos, con la administración de una dosis subóptima o un precoz momento de administración (59).

Estudios de fase III de neuroprotección con EPO están en curso en Europa (Efficacy of Erythropoietin to Improve Survival and Neurological Outcome in Hypoxic Ischemic Encephalopathy [Neurepo], NCT01732146) y en Australia (Erythropoietin for Hypoxic Ischaemic Encephalopathy in Newborns [PAEAN] NCT03079167). Cada uno de estos estudios utiliza diferentes estrategias de dosificación, puntos de inicio, frecuencias de administración y duración de la terapia para poder determinar el papel que la EPO debe ejercer en el tratamiento de la EHI (57).

Asimismo, se ha puesto en marcha un ensayo clínico de fase I/II (Darbe Administration in Newborns Undergoing Cooling for Encephalopathy [DANCE], NCT01471015) cuya finalidad es valorar la farmacocinética y la seguridad de la HT administrada junto con la Darbepoetin alfa, una molécula derivada de la rhEPO que tiene una vida media prolongada y una actividad biológica comparable con la EPO.

5.2.3. Cannabidiol

El cannabidiol (CBD) es el componente neuroactivo no psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* (60). El CBD se emplea para tratar el dolor, las náuseas y los vómitos, los espasmos musculares, el insomnio, la ansiedad, la epilepsia y enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (61, 62).

Los cannabinoides son compuestos neuroprotectores prometedores debido a sus efectos beneficiosos sobre parámetros asociados con la fisiopatología del daño cerebral inducido por el evento hipóxico-isquémico. Los cannabinoides son agentes antioxidantes, antiapoptóticos, antiinflamatorios y vasodilatadores. Asimismo, modulan la excitotoxicidad y muestran efectos neuroproliferativos y remielinizantes (63-66).

El CBD muestra un perfil favorable de seguridad y tolerabilidad en humanos (62). Múltiples estudios pequeños sobre la seguridad del CBD en humanos adultos han demostrado que se tolera bien en un amplio rango de dosis, no se han visto efectos secundarios significativos con dosis de hasta 1.500 mg/día vía oral o 30 mg vía intravenosa (67). Aun así, hay cierto riesgo teórico de inmunosupresión, ya que se ha demostrado que el CBD suprime la producción de interleucina 8 y 10 e induce la apoptosis de los linfocitos *in vitro* (68, 69). Existen pocos datos de seguridad para el uso a largo plazo en humanos, y la farmacocinética y la toxicidad en niños no se conoce bien (61).

En ratas recién nacidas, el CBD ha reducido la liberación de glutamato, óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias, disminuyendo la muerte celular (70). Además, el CBD posee beneficios cardíacos, hemodinámicos y ventilatorios (71). Se ha observado que proporciona una neuroprotección duradera y restaura el rendimiento neuroconductual un mes después del evento hipóxico-isquémico (72).

En cerdos recién nacidos, el CBD ha conseguido disminuir el daño neuronal modulando el deterioro hemodinámico y el trastorno metabólico cerebral, previniendo así el desarrollo de edema cerebral y de convulsiones (71, 73). De manera similar, el CBD en cerdos ha logrado restablecer el rendimiento neuroconductual en las 72 horas posteriores al evento hipóxico-isquémico (73).

El CBD sigue siendo neuroprotector cuando se administra 12 horas después del evento hipoxico-isquémico en ratones recién nacidos (61) y muestra efectos neuroprotectores sinérgicos con la HT en cerdos recién nacidos produciendo efectos beneficiosos aditivos (60,74).

Con el objetivo de evaluar la seguridad, tolerabilidad y la farmacocinética del cannabidiol junto con HT en neonatos con encefalopatía hipóxico-isquémica moderada o grave, se está llevando a cabo un ensayo clínico (EudraCT Number: 2016-000936-17) con un total de 13 pacientes de 8 centros clínicos de Polonia, Inglaterra y España. Este estudio tiene un diseño aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, donde se da una dosis única ascendente (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 1,0mg/kg) intravenosa de 15 minutos dentro de las 18 horas posteriores al nacimiento.

5.2.4. Alopurinol

El alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa que reduce la producción de ácido úrico y elimina los radicales libres (75). Se suele emplear en la práctica clínica habitual en pacientes con gota o enfermedades neoplásicas (21). Dado que se cree que las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel importante en la lesión cerebral secundaria tras la reperfusión, se ha investigado el alopurinol como estrategia terapéutica para la EHI (76).

Durante la reperfusión, la renovada disponibilidad de oxígeno inicia el proceso de formación de superóxido y radicales libres produciendo un daño en las mitocondrias y dando lugar al fallo energético secundario (77). Esta lesión por reperfusión, conduce a una lesión cerebral adicional que puede afectar a áreas de tejido cerebral más amplias que el área afectada principalmente durante el evento hipóxico-isquémico (78). En modelos preclínicos con roedores se ha demostrado que el alopurinol reduce la producción de radicales de oxígeno (10,79).

Considerando que la producción de superóxido alcanza su punto máximo dentro de los 30 minutos posteriores al nacimiento, es de suma importancia una administración temprana del alopurinol (78). En un ensayo de fase II aleatorizado y controlado con placebo realizado con 32 neonatos con EHI grave, no se mostraron diferencias en cuanto a la mortalidad y morbilidad tras el tratamiento con alopurinol postnatal. El

número reducido de pacientes, la elevada gravedad de la EHI y el inicio tardío del tratamiento, de tres a cuatro horas después de la reperfusión, se plantean como probables factores causantes de la ineficacia terapéutica (76,80).

El alopurinol presenta pocos efectos adversos y de escasa gravedad, tales como erupciones cutáneas y reacciones de hipersensibilidad (81). Se ha determinado que la administración de 40 mg/kg de alopurinol intravenoso en recién nacidos con EHI grave no tuvo efectos tóxicos cuando se administró a 11 pacientes (82).

Debido a la pequeña ventana terapéutica disponible, a su probada capacidad para atravesar la placenta humana y a su perfil de seguridad, se ha planteado la posibilidad de comenzar el tratamiento antioxidante incluso antes del nacimiento. Un estudio aleatorizado doble ciego ha mostrado una reducción de biomarcadores de daño neuronal cuando el alopurinol se administra inmediatamente antes del parto ante la sospecha de asfixia perinatal. En este estudio se han administrado 500 mg de alopurinol o placebo por vía intravenosa a 53 mujeres embarazadas de más de 36 semanas y signos de hipoxia fetal (83). En consecuencia, está en marcha otro ensayo clínico de fase III (Antenatal Allopurinol During Fetal Hypoxia, NCT00189007), donde 222 embarazadas van a recibir alopurinol durante el trabajo de parto con la intención de demostrar la reducción significativa de la producción de radicales libres y marcadores de daño neuronal por reperfusión posterior al evento hipóxico-isquémico.

Para valorar el efecto del alopurinol como adyuvante de la TH, está en proceso de reclutamiento un ensayo clínico de fase III (Effect of Allopurinol for Hypoxic-ischemic Brain Injury on Neurocognitive Outcome [ALBINO], NCT03162653). El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia y la seguridad del alopurinol administrado en conjunto con la HT en 846 neonatos a término con EHI; para ello se va a valorar la incidencia de muerte y el deterioro grave del desarrollo neurológico a los 24 meses de edad (77,78).

Aún no se ha investigado el papel preventivo y/o terapéutico que el alopurinol podría ejercer en recién nacidos pretérmino con EHI (76).

5.2.5. N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es un precursor de la cisteína que posee efectos antioxidantes. Es un posible agente neuroprotector debido a que atraviesa la barrera hematoencefálica y tiene un amplio perfil de seguridad en recién nacidos humanos en forma intravenosa (84). De acuerdo con la evidencia existente, la NAC alivia el estrés oxidativo eliminando radicales libres y restaurando los niveles de glutatión intracelular (85).

Con el propósito de analizar el efecto neuroprotector del antioxidante N-acetilcisteína, se ha llevado a cabo un estudio preclínico en 29 cerdos recién nacidos sometidos a lesión hipóxico-isquémica. Se ha logrado observar una reducción de los niveles de marcadores inflamatorios en la corteza prefrontal de los cerdos, apoyando así los posibles efectos neuroprotectores de la terapia con N-acetilcisteína (86).

Otro estudio ha analizado la NAC como agente terapéutico en un modelo de rata con lesión HI neonatal para explorar los efectos conductuales a largo plazo. Los resultados han revelado que la NAC reduce el daño cerebral y alivia significativamente los déficits sensoriomotores. Las mejoras de la funcionalidad indican que la NAC también puede activar mecanismos de reparación y plasticidad del cerebro, ejerciendo un triple efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiapoptótico (87).

Además, cuando se combina la NAC con la HT, disminuye la pérdida de volumen cerebral, aumenta la expresión de mielina y mejora los resultados funcionales tras la lesión cerebral hipóxico-isquémica en ratas recién nacidas (84).

Una pequeña cohorte de 24 recién nacidos a término con EHI que se habían sometido a HT, han mostrado un aumento significativo de glutatión en los ganglios basales observados en la espectroscopia de RMN dentro de los 30 minutos posteriores a la administración intravenosa de NAC. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar la eficacia y seguridad de NAC en EHI (88).

5.2.6. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) son uno de los tres tipos de células multipotentes derivadas de las células madre embrionarias (28). Las CMM tienen la propiedad de autorenovarse y diferenciarse en distintas células especializadas de un determinado linaje (89).

Hay varias fuentes de células madre multipotentes en el cuerpo humano, como la médula ósea. Sin embargo, obtener CMM de la médula ósea es un proceso invasivo. Hoy en día, la gelatina de Wharton y el tejido o la sangre del cordón umbilical, se consideran la fuente potencial de células madre (90).

Las ventajas del tratamiento de CMM de sangre de cordón umbilical en recién nacidos que sufren EHI son la fácil disponibilidad y aislamiento de las células, la carencia de conflicto ético ya que se obtienen de tejidos neonatales desechados, menor riesgo de reacción inmune injerto contra huésped, la nula necesidad de inmunosupresión para el trasplante autólogo y evitan la posibilidad de formación de tumores a diferencia de la terapia con células embrionarias (91,92). Las células de sangre de cordón umbilical se han utilizado con éxito en trasplantes alogénicos para cáncer y enfermedades genéticas (93).

Se ha descrito su potencial neuroregenerativo, antiapoptótico, antiexcitatorio, antioxidante e inmunomodulador, muy probablemente debido a los efectos paracrinos y tróficos que poseen (28,92).

Estudios preclínicos presentan resultados contradictorios respecto al potencial terapéutico de combinar la HT con las CMM. Un estudio ha demostrado que la HT junto con la infusión de CMM, produce una disminución del daño cerebral y extiende la ventana de tiempo terapéutico para el trasplante de CMM en EHI neonatal grave (94). La evidencia acumulada basada en estudios preclínicos, sugiere que la ventaja de la terapia combinada podría estar en que la HT ejerce neuroprotección temprana en la EHI, mientras que las CMM podrían tener un papel neurorestaurador durante la etapa crónica de la enfermedad que comienza días después (95). Por el contrario, el otro estudio ha llegado a la conclusión de que la HT modula la función de las CMM revirtiendo así los efectos protectores observados con cada terapia de manera individual (96).

Se ha evaluado la viabilidad y seguridad de la infusión autóloga de células sanguíneas del cordón umbilical (A Multi-site Study of Autologous Cord Blood Cells for Hypoxic Ischemic Encephalopathy, NCT02612155). Para ello, se han incluido 23 recién nacidos con EHI tratados con HT, que han recibido hasta 4 dosis de 1 a 5×10^7 células/kg por vía intravenosa. Aparte de un descenso ligero en la saturación de oxígeno, no observan efectos adversos significativos y se ha demostrado que la recolección, preparación e infusión de células no criopreservadas, es un proceso seguro y factible (93).

También se han realizado dos estudios de fase I que han concluido que el perfil de seguridad de la infusión de CMM, incluye únicamente efectos secundarios leves con resolución en las primeras 24 horas. El primero se realizó con 6 neonatos con edad gestacional > 35 semanas con EHI moderada-grave. Tres recién nacidos recibieron una infusión de 2×10^6 células/kg por vía intravenosa en las primeras 48 horas y los otros 3 recibieron una segunda dosis adicional a los 2 meses (93). En el segundo estudio se seleccionaron pacientes pediátricos con EHI con deficiencias funcionales significativas, que tenían opciones limitadas de tratamiento, en los que se probó la infusión múltiple y de vía triple. Se administraron CMM derivadas de gelatina de Wharton por vía intratecal, intramuscular e intravenosa a una dosis de 1×10^6 células/kg para cada vía de administración dos veces al mes durante 2 meses (90).

La vía de administración intracraneal se emplea con frecuencia en estudios preclínicos, pero para la aplicación clínica resulta una vía muy invasiva. La vía intravenosa es eficaz, pero la pérdida de las células en los órganos periféricos es un inconveniente. Por estas razones, se ha investigado y comprobado la eficacia de la vía intranasal como vía de entrada alternativa no invasiva (97).

El protocolo para la terapia con células madre varía considerablemente entre los estudios. Los estudios difieren en el tipo de células madre utilizadas y en el tejido en el que se aislaron. Asimismo, no hay un estándar que determine la dosis de células segura, la cantidad de repeticiones de tratamiento, la vía de administración y la ventana de tratamiento tras el evento hipoxico-isquémico (91, 98).

5.2.7. Xenón

El xenón es un gas noble que se emplea en la práctica clínica como anestésico volátil que actúa como antagonista parcial de los receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (99, 100). Atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y garantiza una rápida inducción de la anestesia dada su administración por vía inhalatoria (21). Se elimina a través de la respiración en cuestión de minutos cuando se detiene la administración y, por lo tanto, es una intervención potencialmente reversible (101).

El xenón tiene acción antiapoptótica (102), antiinflamatoria (103), y reduce la liberación de neurotransmisores excitotóxicos (99, 104). Una propiedad importante del xenón es su papel regulador frente a otras proteínas neuroprotectoras como la EPO y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (105).

La eficacia del xenón se ha estudiado en modelos animales de EHI neonatal (106). Varios estudios preclínicos han demostrado los beneficios del tratamiento con xenón dentro de las 6 horas posteriores al evento hipóxico-isquémico con dosis del 30-50% durante 3 a 5 horas, como lo revelan los hallazgos histopatológicos y los resultados neurológicos (107-109). Además, numerosos estudios respaldan que el cotratamiento de TH y xenón podría proporcionar una mejor neuroprotección tras la EHI (108,110) excepto en la asfixia grave (111).

Como anestésico ya ha demostrado ser seguro y bien tolerado en adultos sin patologías cerebrales (112). Sin embargo, una revisión ha mostrado que en modelos animales el xenón puede desencadenar la neurodegeneración en el cerebro en desarrollo (113).

Un estudio en cerdos recién nacidos ha proporcionado los datos de seguridad para respaldar el primer estudio de viabilidad del uso de xenón en recién nacidos con EHI. El estudio en humanos se ha llevado a cabo entre marzo de 2010 y abril de 2011 usando inhalación de xenón al 50% durante 18 horas en combinación con 72 horas de HT en 14 recién nacidos humanos con EHI. No se han observado efectos adversos respiratorios o cardiovasculares. El xenón ha incrementado la sedación y ha conseguido suprimir la actividad convulsiva. Tres recién nacidos han fallecido y 7 de los 11 restantes han presentado un buen desarrollo mental a los 18-20 meses de seguimiento (101).

Total Body hypothermia plus Xenon (Neuroprotective Effects of Hypothermia Combined With Inhaled Xenon Following Perinatal Asphyxia [TOBYXe], NCT00934700) es un ensayo clínico controlado y aleatorizado de grupos paralelos que se ha llevado a cabo en cuatro unidades de cuidados intensivos en Reino Unido. Se incluyeron 92 recién nacidos con una edad gestacional de entre 36 y 43 semanas y con signos de EHI moderada-grave. Los bebés han sido tratados con HT durante 72 horas, la cual ha dado comienzo dentro de las 6 horas posteriores al nacimiento y xenón al 30 % durante 24 horas, dentro de las 10 horas después de sufrir una EHI moderada/grave. Aunque el xenón no ha mostrado un beneficio estadísticamente significativo a corto plazo, esto puede explicarse por el momento subóptimo de inicio del tratamiento con xenón, el período de su duración, o por la gravedad de la asfixia (110).

Un ensayo clínico de fase II (Xenon and Cooling Therapy in Babies at High Risk of Brain Injury Following Poor Condition at Birth [CoolXenon3], NCT02071394) aleatorizado, de grupos paralelos y controlado con HT aislada en curso, tiene como objetivo examinar el efecto del gas xenón inhalado en el tratamiento de recién nacidos con EHI en combinación con la HT. Para ello han reclutado 50 recién nacidos con EHI derivados a la unidad neonatal para recibir la terapia estándar de HT durante 72 horas en combinación con gas xenón al 50% durante 18 horas, con el propósito de estudiar la incidencia de muerte y discapacidad moderada o grave a los 18-24 meses de seguimiento.

A pesar de los beneficios del xenón en la excitotoxicidad, su uso es limitado debido a sus altos costos de fabricación y a la necesidad de intubación para su administración (114). Además, aún existen dudas sobre la concentración adecuada, el inicio y la duración óptima de aplicación y los efectos a largo plazo (28, 104). Para solucionar el inconveniente económico, se ha desarrollado un sistema de administración de xenón que consiste en implantar un circuito de suministro cerrado que aproveche el xenón exhalado, eliminando el dióxido de carbono y agregando el oxígeno y el xenón para reemplazar la absorción de los gases por el paciente. Aun así, es poco probable que en un futuro cercano este sistema de administración pueda estar ampliamente disponible (101, 114).

5.2.8. Topiramato

El topiramato es un medicamento antiepiléptico antagonista del receptor AMPA/kainato que reduce la neurotransmisión excitatoria (115,116).

El topiramato ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos animales de EHI. Concretamente se ha observado que la administración temprana de topiramato en combinación con la HT, reduce la lesión cerebral por hipoxia-isquemia en un modelo de accidente cerebrovascular en roedores neonatales (117). Otro estudio preclínico muestra que el tratamiento exclusivo con topiramato ofrece neuroprotección en lechones recién nacidos con EHI (118).

Antes de considerar el topiramato apto para llevar a cabo un ensayo clínico con HT, es necesario conocer la influencia de la hipotermia en la farmacocinética del topiramato. Para ello se han seleccionado 13 recién nacidos a término, a los que se les ha inducido hipotermia corporal durante 72 horas y dosis orales de 5 mg/kg de topiramato durante 3 días. Las concentraciones de topiramato se han mantenido dentro del rango de referencia (de 5 a 12 mg/kg) en 11 de los 13 recién nacidos durante toda la duración del tratamiento, lo que demuestra que la absorción oral de topiramato se ha sostenido durante la hipotermia; en los otros 2 restantes, ha excedido el límite superior. La hipotermia ha aumentado las concentraciones de topiramato en comparación con estudios previos en neonatos normotérmicos, aunque no se han informado efectos adversos relacionados con el uso de topiramato (119,120).

En un segundo estudio los autores han investigado la seguridad del topiramato asociado a la hipotermia en recién nacidos a término con EHI. Se han seleccionado 27 recién nacidos tratados con HT y 27 adicionales con hipotermia y topiramato oral una vez al día durante 3 días consecutivos en 2 dosis diferentes (3 mg/kg y 5 mg/kg). A pesar del reducido número de recién nacidos en el estudio, no ha habido diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los efectos adversos a corto plazo, la tasa de supervivencia al alta o la incidencia de resonancia magnética cerebral patológica. Estos datos de seguridad parecen respaldar la evaluación del topiramato en ensayos clínicos a mayor escala, aunque todavía queda realizar un seguimiento a los neonatos para poder evaluar los efectos a largo plazo sobre las funciones cognitivas (121).

Se ha llevado a cabo un ensayo clínico (Safety and Efficacy of Topiramate in Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy Treated With Hypothermia [NeoNATI], NCT01241019) con el objetivo de evaluar la seguridad y la eficacia del topiramato en asociación con la hipotermia en 64 recién nacidos a término con EHI. Este estudio ha mostrado que la administración de topiramato 10 mg/kg una vez al día durante los primeros 3 días es segura, pero no reduce significativamente la mortalidad ni la discapacidad neurológica grave. Sin embargo, ha conseguido disminuir la prevalencia de las convulsiones (122).

Otro ensayo clínico de mayor escala ha sido llevado a cabo en 110 neonatos con EHI. La finalidad del estudio ha sido evaluar la eficacia del topiramato (5 mg/kg de carga y 3 mg/kg durante 5 días de mantenimiento por sonda nasogástrica) en la reducción la actividad epiléptica en neonatos con hipotermia inducida y valorar si como consecuencia se disminuye el daño cerebral. El grupo de topiramato ha tenido menos convulsiones en las primeras 24 horas de hipotermia, ha necesitado menos medicación adicional y ha mantenido una mortalidad más baja. Sin embargo, estos resultados no han alcanzado la significación estadística. Este resultado es debido a la baja dosis empleada para prevenir la toxicidad y los efectos secundarios desconocidos. En consecuencia, un número elevado de neonatos se han mantenido por debajo del rango de eficacia terapéutica en las primeras 48 horas, apoyando así la necesidad de más estudios con mayores dosis ya que como el topiramato sólo puede administrarse por vía oral, su farmacocinética puede verse afectada por la terapia hipotérmica (123).

Debido a la falta de consenso establecido en cuando a la dosis adecuada de topiramato en neonatos con EHI sometidos a hipotermia, se ha propuesto diseñar un programa de dosificación capaz de proporcionar concentraciones séricas dentro del rango terapéutico aceptado. Proponen probar un programa de dosificación alternativo (15 mg/kg el primer día y una dosis de 5 mg/kg los 4 días siguientes) ya que se predice que de esta manera las concentraciones séricas objetivo se alcanzarían en más del 90% de los recién nacidos después de la primera dosis. No obstante, esta dosificación podría plantear problemas de seguridad (124).

En definitiva, estos resultados sugieren la necesidad de ensayos clínicos más grandes y con dosificaciones más elevadas para evaluar la eficacia y seguridad del topiramato.

5.2.9. Sulfato de magnesio

El sulfato de magnesio (MgSO₄) es un agente antiexcitotóxico endógeno que actúa sobre el receptor N-metil-D-aspartato lo que le convierte en un anticonvulsivo útil (116,125).

Se ha evaluado la eficacia neuroprotectora del MgSO₄ 180 mg/kg en bolo y 8 mg/kg en infusión durante 48 horas más TH en un modelo preclínico de 15 lechones a término con EHI. Este estudio ha mostrado un beneficio limitado del MgSO₄ y HT en comparación con la HT en monoterapia, mostrando una mayor supervivencia neuronal y una buena tolerancia al fármaco, pero sin modificaciones en el EEG o las medidas de espectroscopia de RMN (126).

En conformidad con el estudio preclínico anterior, una revisión sistemática de estudios en animales sobre el efecto del MgSO₄ en la EHI ha mostrado evidencia inconsistente a cerca de su eficacia terapéutica, así como poco consenso en la dosis y el momento de la administración. Asimismo, se ha observado que los estudios que mostraron efectos neuroprotectores hay una falta de control de la temperatura mientras que los estudios que controlaron la temperatura estrictamente mostraron consistentemente una falta de beneficio con MgSO₄ (127).

Un ensayo multicéntrico aleatorio, controlado y doble ciego de 60 neonatos con EHI moderada-grave ha informado que el MgSO₄ (3 dosis de 250 mg/kg intravenoso) combinado con hipotermia (72 h de enfriamiento a 33,5 °C seguido de recalentamiento lento durante un período de 8 h) no se ha asociado con ningún efecto adverso a corto plazo adicional en comparación con la HT sola (128).

De manera similar, en otro ensayo en el que han participado 75 recién nacidos con EHI moderada-grave se ha observado que el MgSO₄, con el mismo régimen de dosificación, más HT es seguro y conlleva una mejoría del estado neurológico a los 5 días de edad (129).

Sin embargo, se necesitan más estudios amplios y bien diseñados ya que todavía no se han determinado los resultados de la seguridad, supervivencia y el desarrollo neurológico a largo plazo (130).

5.2.10. 2-Iminobiotin

La 2-Iminobiotina (2-IB) es un análogo de la biotina (vitamina B7) cuya función es inhibir la óxido nítrico sintasa neuronal. Aunque aún no se ha definido el mecanismo de acción concreto, el 2-IB protege potencialmente contra la lesión cerebral hipóxico-isquémico al prevenir el daño mitocondrial inducido por el óxido nítrico (100, 131).

El 2-IB en normotermia ha demostrado ser capaz de reducir el daño de las células neuronales en modelos preclínicos (77). La administración de 2-IB en ratas con hipoxia-isquemia de 12 días de edad ha logrado reducir el daño neuronal tanto a corto como a largo plazo (131). Un estudio de escalada de dosis en un modelo de lechón ha demostrado que el 2-IB administrado por vía intravenosa cada 4 horas en dosis de 0,1-1,0 mg/kg/día es seguro y eficaz (132).

Se ha realizado un estudio in vitro para evaluar el potencial de atenuación de la lesión hipóxico-isquémica con 2-IB (10-30 ng/ml) más HT. El 2-IB no ha reducido eficazmente la producción de radicales libres, pero si ha conseguido disminuir la liberación de lactato deshidrogenasa y ha mostrado una discreta actividad antiapoptótica (133).

Se ha completado en Turquía un ensayo piloto de fase II (A Study of 2-Iminobiotin in Neonates with Perinatal Asphyxia, NCT01626924) abierto de 6 recién nacidos a término con EHI moderada-grave que han sido expuestos a recibir 0,2 mg/kg cada 4 horas hasta un total de 6 dosis de 2-IB iniciando la terapia dentro de las 6 horas posteriores al nacimiento. Los resultados primarios del estudio incluyen el cociente lactato/N-acetil-aspartato de los ganglios basales medido por espectroscopia de RMN entre el 3-7º día después del nacimiento y la supervivencia a las 48 horas con un EEG normal (100,116).

El fin de un segundo estudio (EudraNCT: 2015-003063-12) fue investigar la seguridad y la farmacocinética de 2-IB en entornos de bajos recursos. Se han incluido 7 neonatos a término nacidos en la República Democrática del Congo. Han recibido 6 infusiones con intervalos de 4 horas de 0,16 mg/kg de 2-IB antes de las 6 horas tras el nacimiento. Tres pacientes han fallecido por infección neonatal e hipoglucemia, pero no se han detectado efectos adversos que puedan atribuirse al uso de 2-IB. El régimen de

dosificación empleado ha resultado en un área bajo la curva (AUC) más alta que la prevista, lo que requiere un cambio en la dosis en futuros ensayos clínicos (134).

Para valorar la seguridad y la tolerabilidad del 2-iminobiotin junto con el perfil farmacocinético en asociación con HT, se ha llevado a cabo un ensayo clínico (EudraNCT: 2014-004265-25) abierto con dos cohortes de 6 recién nacidos a los que se les ha administrado cuatro dosis cada 6 horas de 0,16mg/kg y 0,08 mg/kg por vía intravenosa dentro de las 12 horas posteriores al nacimiento. No se han observado cambios en los signos vitales o eventos adversos relacionados con la toma del fármaco y once de los doce pacientes sobrevivieron en estas 2 cohortes de pacientes con EHI grave-moderada. Estos resultados indican que la 2-IB es bien tolerada en los recién nacidos tratados con HT después de la asfixia perinatal (135).

5.3. TERAPIAS EMERGENTES EN FASE PRECLÍNICA

Puesto que la HT es la terapia más extendida y, actualmente, la terapia estándar implantada como tratamiento de los efectos nocivos de la EHI, se ha convertido en la base del desarrollo de terapias combinadas. Los tratamientos combinados pretenden aprovechar los efectos protectores de cada uno de los componentes, consiguiendo así una potenciación del beneficio terapéutico.

5.3.1. Memantina

La memantina es un antagonista del receptor NMDA que inhibe la sobreactivación de estos receptores durante la excitotoxicidad (116).

La actividad neuroprotectora de la memantina se ha demostrado en estudios in vitro e in vivo (136). Por un lado, los cultivos de células neuronales ganglionares retinianas y corticales de rata tratadas con 6-12 μ m de memantina expresaron actividad antiexcitotóxica. Por otro lado, la administración de 20 mg/kg de memantina 1 hora antes de la lesión y una dosis de mantenimiento de 1 mg/kg cada 12 horas, ha logrado disminuir el tamaño de infarto cerebral en un modelo de lesión hipóxico-isquémico en ratas neonatales (28,137).

La memantina (dosis de carga de 20 mg/kg y 1 mg/kg cada 12 horas durante 2 días) se ha probado como terapia combinada con topiramato (dosis de carga de 40 mg/kg y 10 mg/kg cada 12 horas durante 2 días) en un modelo de rata de lesión cerebral hipóxico-isquémica, lo que ha demostrado la preservación de la masa cerebral y la actividad neurofuncional (138).

También se ha demostrado que ambos fármacos pueden atenuar el daño neuronal y el tamaño del infarto después de 24 horas en modelos animales de rata con hipoxia-isquemia. Asimismo, han observado que la combinación de estos fármacos con la hipotermia, potencia los efectos neuroprotectores en la reducción del infarto cerebral. Para ello se ha llevado a cabo un estudio con ratas sometidas a 120 minutos de hipoxia a las que han administrado topiramato o memantina 20 mg/kg de inmediato y 2 horas después de la hipoxia o exposición a hipotermia (32 °C durante 4 horas iniciado 1 hora después de la hipoxia) (139).

En particular, la memantina ha mostrado un mayor grado de neuroprotección en comparación con el topiramato, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere que la memantina podría ser más ventajosa como agente terapéutico en recién nacidos con EHI tratados con HT (139). Sin embargo, aún se necesitan estudios clínicos para evaluar la seguridad de la memantina en el tratamiento de neonatos con EHI (28).

Estos estudios plantean la posibilidad de explorar no sólo la eficacia del topiramato sino también de la memantina en neonatos con EHI tratados con hipotermia.

5.3.2. Exenatida

La exenatida es un agonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) que regula la glucosa en sangre principalmente a través de la estimulación de la secreción de insulina en el páncreas y, por lo tanto, se emplea como fármaco para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (30,140).

La exenatida cruza eficientemente la barrera hematoencefálica (30,141). Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la exenatida tiene efectos neuroprotectores, neurotróficos, antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos dando lugar a ensayos clínicos en curso para evaluar su papel en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer (30,142).

Se ha realizado un estudio preclínico con el objetivo de estudiar la seguridad y la tolerancia de la exenatida, demostrar su eficacia neuroprotectora y la capacidad de empleo sinérgico con la HT.

La administración intraperitoneal de 0,5 mg/g de exenatida con un régimen de 4 dosis con intervalos de 12 horas iniciado inmediatamente después de la hipoxia-isquemia inducida en modelo de ratón, ha resultado ser significativamente neuroprotectora. El retraso de inicio del régimen de 2 horas no disminuye la capacidad neuroprotectora del fármaco, pudiéndose ampliar así la ventana terapéutica. Este efecto protector se ha observado en varios marcadores histopatológicos percibiéndose una reducción en el tamaño del infarto, la muerte celular y la inflamación (141).

Se ha comprobado la seguridad y la tolerancia de la administración de repetidas dosis altas de exenatida, no observándose niveles de glucosa en sangre alterados y recuperando la reducción del peso inicial (141).

Igualmente, se ha demostrado que la exenatida se puede usar en combinación con la hipotermia, el estándar clínico actual de atención para la EHI. La terapia combinada simultánea iniciada 10 minutos después de la hipoxia-isquemia mejora notablemente la eficacia terapéutica de la HT obteniendo una mejor puntuación macroscópica del tejido, pero no logrando una diferencia significativa respecto al volumen general de infarto (141).

Dada la evidencia actual de la existencia de una marcada neuroinflamación persistente después de la hipotermia terapéutica, se plantea la posibilidad de modular esta inflamación con exenatida una vez finalizada la HT. Se necesitan estudios futuros para investigar el momento óptimo para la administración de exenatida y probar su eficacia y seguridad en grandes modelos de animales (125).

5.3.3. Edaravona

La edaravona es un potente eliminador de radicales libres sintético lo que sugiere que podría poseer un papel protector en la EHI neonatal (143,144).

Se ha realizado recientemente un estudio cuyo objetivo ha sido comparar los efectos neuroprotectores de la edaravona más HT frente los de la HT sola en un modelo de 21 lechones recién nacidos con hipoxia-isquemia inducida. El régimen de dosis ha sido 3 mg/kg intravenosos cada 12 horas durante 3 días y la hipotermia se ha inducido a 33,5 °C durante 24 horas. No se ha visto una mejoría en las evaluaciones neurológicas ni histopatológicas en el grupo de HT combinada con edaravona. Es necesario contemplar la posibilidad de que la eficacia óptima esté influenciada por la dosis, el número, el intervalo y la vía de administración del fármaco. También existe la opción de que la edaravona no sea eficaz en condiciones de HT o que la población experimental sea pequeña (145).

5.3.4. 17 β -Estradiol

Un derivado del estrógeno, el 17 β -estradiol, es una hormona sexual femenina relacionada con el desarrollo de las características sexuales secundarias, el almacenamiento de la grasa y la regulación del ciclo menstrual (146). El 17 β -estradiol que originalmente ha sido administrada como terapia de reemplazo hormonal para aliviar los síntomas del climaterio, ha mostrado tener efectos beneficiosos en el rendimiento de la memoria verbal y visual (147, 148).

Los mecanismos de protección neuronal de la terapia con estrógenos incluyen la inhibición de la apoptosis y la excitotoxicidad junto con la reducción del estrés oxidativo y la inflamación, siendo esta última su principal propiedad neuroprotectora (149). No obstante, los resultados favorables de la terapia con estrógenos varían según el tiempo, el método y la dosis de administración, teniendo un rango de concentración terapéutico muy estrecho (150-152).

A pesar de la controversia, se ha realizado un estudio cuya hipótesis ha sido que una concentración baja de 17 β -estradiol ejerce un efecto neuroprotector que se maximiza con la combinación de HT. Han probado esta presunción en un modelo que incluye 21 ratas con hipoxia-isquemia sometidas a una dosis única de 10 μ g/kg 17 β -estradiol vía

intraperitoneal más HT 33°C durante 2 horas. El déficit neurológico y la lesión neuronal del hipocampo han sido evaluadas 72 horas después de la isquemia. El grupo que ha recibido 17 β -estadiol y el grupo que ha recibido sólo HT han mostrado resultados similares, pero se ha observado una notable diferencia en el aumento de densidad de neuronas piramidales en el grupo que se ha sometido a terapia combinada 17 β -estadiol y HT (152).

Los mecanismos neuroprotectores distintivos pero complementarios de estas terapias podría ser la causa de su efecto sinérgico. Con todo, son imprescindibles más estudios para establecer el régimen de dosificación adecuado que minimice los efectos secundarios del 17 β -estadiol, como la feminización y la carcinogenicidad, sin dejar de tener los efectos terapéuticos esperados (152).

5.3.5. Hidrógeno y argón

La terapia combinada de gases nobles y HT es una de las posibles estrategias neuroprotectoras para la EHI neonatal.

Se ha investigado el efecto del argón en combinación con la HT en modelos animales. En un estudio in vivo de ratas recién nacidas privadas de oxígeno y expuestas a 70% de argón durante 2 horas, se ha advertido una disminución del tamaño del infarto cerebral, proporcionando neuroprotección contra el daño por hipoxia-isquemia cerebral (153).

Otro estudio preclínico con 8 lechones recién nacidos hipóxicos ha evidenciado que la ventilación con hasta 50% de argón en combinación con la HT es una terapia segura (154).

Asimismo, la administración durante 24 horas de 45-50% argón inhalado iniciado a las 2 horas del evento hipóxico-ísquémico ha producido una reducción del lactato, una recuperación de la electroencefalografía de amplitud integrada (aEEG) más rápida y una disminución de la muerte celular a las 24 y 48 horas en otro modelo animal de lechones (155).

Usando un modelo de rata neonatal se ha determinado que la inhalación de hidrógeno al 2% en ratas de 7 días ha reducido la pérdida neuronal en la corteza y el hipocampo, incluso con el inicio de la inhalación 30 minutos después de la isquemia (156). Sin

embargo, el hidrógeno al 2,9% ha resultado ineficaz en otro estudio con ratas de 10 días con EHI grave, determinándose que la neuroprotección podría no sólo depender de la gravedad de la EHI sino también de la edad de las ratas (157).

También se ha estudiado la terapia con hidrógeno en un modelo de lechón con hipoxia. Los lechones que recibieron terapia con hidrógeno (2,1%) han mostrado una mejoría en el EEG, una menor incidencia de convulsiones y una reducción del estrés oxidativo neuronal (158). Como complemento de la HT, se ha observado una mejoría de los resultados neurológicos a corto plazo y de los hallazgos histológicos de la terapia combinada (hidrógeno 2,1-2,7% inhalado + HT 33,0-34,0 °C durante 24 horas) en lechones con EHI neonatal de 5 días (159).

En cuanto a la comparación de la intervención terapéutica con gases nobles, por un lado, hay que destacar que el hidrógeno ejerce efectos protectores en bajas concentraciones (2-4%) vía inhalatoria, mientras que el xenón y el argón requieren concentraciones más elevadas (50%). Por otro lado, el argón y el hidrógeno son más económicos que el xenón, pudiendo ser factible su aplicación en países en vías de desarrollo (160).

Para probar su potencial terapéutico, se requieren ensayos clínicos bien diseñados que permitan una adecuada optimización del régimen de administración y verificar los resultados neuroprotectores a largo plazo. Además, aún se requieren más estudios sobre la seguridad y la viabilidad de estos gases en modelos de animales grandes antes de llevarlos a cabo en recién nacidos humanos (160).

5.3.6. Dexmedetomidina

La dexmedetomidina es un agonista de los receptores adrenérgicos α_2 altamente selectivo. Sus implicaciones clínicas son la sedación, analgesia y ansiolisis, sin provocar depresión respiratoria o alteraciones de la motilidad gastrointestinal (161,162).

Se ha estudiado la posibilidad de suplir el uso de opioides por la dexmedetomidina para el control de la agitación durante la HT puesto que la dexmedetomidina tiene ventajas tales como: menor necesidad de sedantes adyuvantes, una extubación más

temprana, una interrupción precoz de los sedantes y una menor inestabilidad hemodinámica y respiratoria (163, 164).

Igualmente, cada vez hay más pruebas de que la desmedetomidina tiene una función neuroprotectora adicional. Se ha descrito su acción como (165) e inmunomodulador reduciendo la expresión del factor de necrosis tumoral- α (166) en modelos de roedores con EHI. Se ha observado que la dexmedetomidina protege al cerebro en desarrollo de la excitotoxicidad, pudiendo reducir el tamaño de las lesiones corticales y de la sustancia blanca (167).

La farmacocinética y la seguridad de la dexmedetomidina se ha evaluado en un estudio de fase I abierto. Se han incluido 7 neonatos a término con EHI moderada-grave que han recibido una infusión continua de dexmedetomidina durante la HT y el periodo de recalentamiento de 6 horas (dosis de inicio de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ y alcanzando el estado estacionario de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ después de 2,5 horas). La dosis empleada ha sido segura y, en general, el aclaramiento fue menor, la distribución mayor y la vida media de eliminación más prolongada en comparación con los recién nacidos normotérmicos sin EHI. Las concentraciones plasmáticas aumentaron más lentamente en las horas iniciales por lo que podría plantearse aumentar la dosis de carga para superar el retraso inicial de la concentración plasmática de dexmedetomidina en recién nacidos con EHI tratados con hipotermia (168).

Son necesarios ensayos clínicos futuros para evaluar la eficacia de la dexmedetomidina como agente neuroprotector para la EHI en recién nacidos.

6. CONCLUSIONES

Junto con las terapias anteriormente descritas, se están llevando a cabo avances significativos en el desarrollo de una amplia variedad de enfoques de tratamientos experimentales frente a la EHI neonatal. Por un lado, se está reconsiderando el lactato como un sustrato energético eficiente para el sistema nervioso central, ya que el cerebro inmaduro tiene una alta capacidad para utilizarlo como combustible alternativo tras una lesión cerebral y así ahorrar glucosa para emplearla en otros mecanismos de reparación tisular. De este modo se podría modificar el concepto del lactato como producto de desecho de la glucólisis anaerobia y un signo de daño tisular isquémico (169).

Por otro lado, a consecuencia de la alta frecuencia de infección en los partos prematuros y al incremento del daño neuronal que supone, se están desarrollando múltiples terapias experimentales en fase preclínica para la EHI exacerbada por una infección bacteriana. Asimismo, como resultado de la necesidad de tratamientos adicionales o alternativos para reemplazar o aumentar la eficacia de la HT, se están desarrollando nuevas terapias que podrían ser prometedoras, pero aún necesitan una base de evidencia científica mayor para ser consideradas como potencial tratamiento para la EHI (170).

Asimismo, recientes investigaciones comienzan a cuestionarse la influencia que podría tener el sexo en el tratamiento de la EHI. Se han advertido diferencias en la fisiopatología de los mecanismos de daño involucrados en la EHI que podrían suponer un abordaje terapéutico distinto según el sexo. Los animales de experimentación hembras han mostrado una mayor capacidad antiinflamatoria y neuroregenerativa mientras que los machos parecen ser más susceptibles al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial tras la hipoxia-isquemia neonatal, sufriendo más déficits cognitivos a largo plazo (171-173).

En definitiva, se han observado resultados neurológicos alentadores con el empleo de herramientas terapéuticas como la melatonina o la eritropoyetina. No obstante, diversos estudios experimentales han mostrado resultados inconsistentes acerca de la eficacia de las nuevas terapias propuestas contra la EHI, posiblemente a causa de los diversos modelos de animales, protocolos, vías de administración y dosis empleadas.

Además, las conclusiones pueden diferir dependiendo del uso concomitante de la HT o no, ya que su aplicación puede modificar la eficacia de los tratamientos. También se ha observado que la infección perinatal, el sexo masculino, el grado de prematuridad, la gravedad y el tiempo transcurrido tras el evento hipóxico-isquémico son determinantes para conseguir una adecuada respuesta al tratamiento.

Por este motivo, todavía son necesarios estudios preclínicos para profundizar en el conocimiento de la fisiopatología del daño neuronal tras la asfixia perinatal y ensayos clínicos correctamente diseñados con un mayor número de sujetos para determinar el rango de dosis, la vía óptima de administración, la duración del tratamiento y la eficacia de las terapias de manera individual o en combinación. Es fundamental hacer un seguimiento de los neonatos con EHI después de implementar cualquier tratamiento para valorar los resultados a largo plazo en el desarrollo neurológico, motor y cognitivo.

Por último, cabe destacar la importancia de centrarse en elaborar estrategias preventivas para limitar el daño neuronal y medidas adaptadas a entornos de bajos recursos donde la atención prenatal deficiente y el acceso limitado a la atención sanitaria, contribuyen al aumento de la morbimortalidad neonatal por asfixia perinatal.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *International journal of stroke*.2009;4(6):461-470.
2. Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh I, et al. Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *IJMS*.2016;17(12).
3. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Early human development*.2010;86(6):329-338.
4. Papazian O. Encefalopatía hipóxica-isquémica neonatal. *Medicina (Buenos Aires)*.2018;78Suppl 2:36-41.
5. Kleuskens DG, Gonçalves Costa F, Annink KV, van den Hoogen A, Alderliesten T, Groenendaal F, et al. Pathophysiology of cerebral hyperperfusion in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review for future research. *Frontiers in pediatrics*.2021;9:631258.
6. Shah P, Riphagen S, Beyene J. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*.2004;89(2):152F.
7. Wang Q, Lv H, Lu L, Ren P, Li L. Neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phases of the injury. *J Matern Fetal Neonatal Med*.2018;32(21):3685.
8. Ristovska S, Stomnaroska O, Danilovski D. Hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) in term and preterm infants. *PRILOZI*.2022;43(1):77-84.
9. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA pediatrics*.2015;169(4):397-403.
10. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clinics in perinatology*.2014;41(1):119-131.
11. Polglase GR, Ong T, Hillman NH. Cardiovascular alterations and multiorgan dysfunction after birth asphyxia. *Clinics in perinatology*.2016;43(3):469-483.

12. Neonatal Encephalopathy and Neurologic Outcome, Second Edition. Pediatrics (Evanston).2014;133(5):1482-1488.
13. Mrelashvili A, Russ JB, Ferriero DM, Wusthoff CJ. The Sarnat score for neonatal encephalopathy: looking back and moving forward. Pediatr Res.2020;88(6):824.
14. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. Arch Neurol.1976 Oct;33(10):696-705.
15. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. BMJ.2010;340:c363.
16. Chiang M, Jong Y, Lin C. Therapeutic hypothermia for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. Pediatrics and Neonatology.2017;58(6):475-483.
17. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. Jornal de Pediatria.2015;91(6): S78.
18. Tagin MA, Woolcott CG, Vincer MJ, Whyte RK, Stinson DA. Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an updated systematic review and meta-analysis. Arch Pediatr Adolesc Med.2012;166(6):558-566.
19. Shankaran S, Laptook AR, Tyson JE, Ehrenkranz RA, Bann CM, Das A, et al. Evolution of Encephalopathy during Whole Body Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. The Journal of pediatrics.2012;160(4):567-572.e3.
20. Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. Journal of cerebral blood flow and metabolism.2004;24(10):1090-1097.
21. Dixon BJ, Reis C, Ho W, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. IJMS.2015;16(9):22368.

22. Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling on death or disability at age 18 months among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association*.2017;318(1):57-67.
23. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al. Neonatal resuscitation: 2010 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Pediatrics*.2010;126(5): e1319-44.
24. Jacobs SE, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Evidence-based child health*.2010;5(1):474-531.
25. Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, Zhou K, Bennet L, Thoresen M, et al. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*.2019;19(1):2-10.
26. Cerio FG, Lara-Celador I, Alvarez A, Hilario E. Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sciences*.2013;3(1):191-214.
27. Montaldo P, Pauliah SS, Lally PJ, Olson L, Thayyil S. Cooling in a low-resource environment: Lost in translation. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*.2015;20(2):72-79.
28. Pedroza-García KA, Calderón-Vallejo D, Quintanar JL. Neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy: perspectives of neuroprotective and neuroregenerative treatments. *Neuropediatrics*.2022;53(06):402.
29. Oliveira V, Kumutha JR, Somanna J, Benkappa N, Bandya P, Chandrasekeran M, et al. Hypothermia for encephalopathy in low-income and middle-income countries: feasibility of whole-body cooling using a low-cost servo-controlled device. *BMJ Paediatr Open*. 2018;2(1):e000245.

30. Victor S, Rocha-Ferreira E, Rahim A, Hagberg H, Edwards D. New possibilities for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur J Pediatr.*2022;181(3):875-887.
31. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awany M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *Journal of perinatology.*2015;35(3):186-191.
32. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology.*2017;15(3):434-443.
33. Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *Journal of pineal research.*2009;46(2):128-139.
34. Ahmed J, Pullattayil S AK, Robertson NJ, More K. Melatonin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: A systematic review & meta-analysis of clinical trials. *European journal of paediatric neurology.*2021;31:38-45.
35. Cardinali DP. An assessment of melatonin's therapeutic value in the hypoxic-ischemic encephalopathy of the newborn. *Frontiers in Synaptic Neuroscience.*2019;11:34.
36. Paprocka J, Kijonka M, Rzepka B, Sokół M. Melatonin in hypoxic-ischemic brain injury in term and preterm babies. *International Journal of Endocrinology.*2019;2019:9626715-11.
37. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martínez-Ibargüen A, Hilario E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. *International Journal of Molecular Sciences.*2013;14(5):9379-9395.
38. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;37(6):1063-70.
39. Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Tang FR, Ling EA. Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the

- developing hippocampus. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland).2008;18(4):533-547.
40. Mayo JC, Sainz RM, Tan D, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*.2005;165(1):139-149.
 41. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal of pineal research*.2008;44(2):157-164.
 42. Robertson NJ, Faulkner R S, Hristova M, Cady EB, Gressens P, Golay X, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain* (London, England).2013;136(Pt 1):90-105.
 43. Shea KL, Palanisamy A. What can you do to protect the newborn brain? *Current opinion in anaesthesiology*.2015;28(3):261-266.
 44. Gringras P, Nir T, Breddy J, Frydman-Marom A, Findling RL. Efficacy and safety of pediatric prolonged-release melatonin for insomnia in children with autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*.2017;56(11):948-957.e4.
 45. Carloni S, Proietti F, Rocchi M, Longini M, Marseglia L, D'Angelo G, et al. Melatonin pharmacokinetics following oral administration in preterm neonates. *Molecules* (Basel, Switzerland).2017;22(12):2115.
 46. Robertson NJ, Lingam I, Meehan C, Martinello KA, Avdic-Belltheus A, Stein L, et al. High-Dose melatonin and ethanol excipient combined with therapeutic hypothermia in a newborn piglet asphyxia model. *Scientific Reports*.2020;10(1):3898.
 47. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: Emerging Role of Erythropoietin in Neonatal Neuroprotection. *Pediatric neurology*.2014;51(4):481-488.
 48. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of Stroke with Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke*.2004;35(7):1732-1737.

49. Jantzie LL, Miller RH, Robinson S. Erythropoietin signaling promotes oligodendrocyte development following prenatal systemic hypoxic–ischemic brain injury. *Pediatric research*.2013;74(6):658-667.
50. Juul, SE, Gillian C. Erythropoietin and neonatal neuroprotection. *Clinics in perinatology*.2015;42(3):469-481.
51. Juul SE, Comstock B, Heagerty P, Mayock D, Goodman A, Hauge S, et al. High-dose erythropoietin for asphyxia and encephalopathy (HEAL): A randomized controlled trial – background, aims, and study protocol. *Neonatology (Basel, Switzerland)*.2018;113(4):331-338.
52. Zhou KQ, Davidson JO, Bennet L, Gunn AJ. Combination treatments with therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic neuroprotection. *Developmental medicine and child neurology*.2020;62(10):1131-1137.
53. Wu YW, Bauer LA, Gonzalez FF, Glass HC, Juul SE, Ballard RA, et al. Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. *Pediatrics (Evanston)*.2012;130(4):683-691.
54. Wu YW, Mathur AM, Chang T, McKinstry RC, Mulkey SB, Mayock DE, et al. High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy: a phase II trial. *Pediatrics (Evanston)*.2016;137(6):1.
55. Elmahdy H, El-Mashad A, El-Bahrawy H, El-Gohary T, El-Barbary A, Aly H. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics (Evanston)*.2010;125(5):1135-1142.
56. Razak A, Hussain A. Erythropoietin in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Perinatal Medicine*.2019;47(4):478.
57. Oorschot DE, Sizemore RJ, Amer AR. Treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy with erythropoietin alone, and erythropoietin combined with hypothermia: history, current status, and future research. *International Journal of Molecular Sciences*.2020;21(4):1487.

58. Juul SE, Comstock BA, Wadhawan R, Mayock DE, Courtney SE, Robinson T, et al. A randomized trial of erythropoietin for neuroprotection in preterm infants. *The New England journal of medicine*.2020;382(3):233-243.
59. Wu YW, Comstock BA, Gonzalez FF, Mayock DE, Goodman AM, Maitre NL, et al. Trial of erythropoietin for hypoxic–ischemic encephalopathy in newborns. *The New England journal of medicine*.2022;387(2):148-159.
60. Barata L, Arruza L, Rodríguez M, Aleo E, Vierge E, Criado E, et al. Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology*.2019;146:1-11.
61. Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*.2014.;55(6):791.
62. Millar SA, Stone NL, Yates AS, O’Sullivan SE. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. *Frontiers in Pharmacology*.2018;9:1365.
63. Alonso-Alconada D, Álvarez A, Álvarez FJ, Martínez-Orgado JA, Hilario E. The cannabinoid WIN 55212-2 mitigates apoptosis and mitochondrial dysfunction after hypoxia ischemia. *Neurochem Res*.2012;37(1):161-170.
64. Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic–ischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology*.2013;71:282-291.
65. Alonso-Alconada D, Álvarez FJ, Goñi-de-Cerio F, Hilario E, Álvarez A. Cannabinoid-mediated modulation of oxidative stress and early inflammatory response after hypoxia–ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*.2020;21(4):1283.
66. Patricio F, Morales-Andrade AA, Patricio-Martínez A, Limón ID. Cannabidiol as a therapeutic target: evidence of its neuroprotective and neuromodulatory function in parkinson’s disease. *Front Pharmacol*.2020; ;11:595635.

67. Bergamaschi MM, Queiroz RHC, Zuardi AW, Crippa JAS. Safety and side effects of cannabidiol, a cannabis sativa constituent. *Current drug safety*.2011;6(4):237-249.
68. Srivastava MD, Srivastava BIS, Brouhard B. Δ^9 Tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*.1998;40(3):179.
69. Wu H, Chu R, Wang C, Lee C, Lin S, Jan T. Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicology and applied pharmacology*.2008;226(3):260-270.
70. Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic–ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. *Neurobiology of disease*.2010;37(2):434-440.
71. Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Moreno E, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic–ischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology*.2013;71:282-291.
72. Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, Layunta R, Santos M, Fernández-Ruiz J, et al. Cannabidiol administration after hypoxia–ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology*.2012;63(5):776-783.
73. Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Carmen Rey-Santano M, Mielgo V, et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatric research*.2011;70(3):272-277.
74. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, Mohammed N, Santos M, Arizti M, et al. Effects of cannabidiol and hypothermia on short-term brain damage in newborn piglets after acute hypoxia-ischemia. *Frontiers in Neuroscience*.2016;10:323.

75. Liu N, Xu H, Sun Q, Yu X, Chen W, Wei H, et al. The role of oxidative stress in hyperuricemia and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors. *Oxidative medicine and cellular longevity*.2021;1470380-15.
76. McNally MA, Soul, JS. Pharmacologic prevention and treatment of neonatal brain injury. *Clinics in perinatology*.2019;46(2):311-325.
77. Albrecht M, Zitta K, Groenendaal F, van Bel F, Peeters-Scholte C. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. *Free Radic Biol Med*.2019;142:123-131.
78. Maiwald CA, Annink KV, Rüdiger M, Benders MJNL, van Bel F, Allegaert K, et al. Effect of allopurinol in addition to hypothermia treatment in neonates for hypoxic-ischemic brain injury on neurocognitive outcome (ALBINO): Study protocol of a blinded randomized placebo-controlled parallel group multicenter trial for superiority (phase III). *BMC.Pediatrics* 2019;19(1):210.
79. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res*. 1993;33(4 Pt 1):405-11.
80. Benders MJ, Bos AF, Rademaker CM, Rijken M, Torrance HL, et al. Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*.2006;91(3): F163.
81. Vázquez-Mellado J, Morales EM, Pacheco-Tena C, Burgos-Vargas R. Relation between adverse events associated with allopurinol and renal function in patients with gout. *Annals of the rheumatic diseases*.2001;60(10):981-983.
82. Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, et al. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics (Evanston)*.1998;101(2):185-193.
83. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CMA, Bos AF, Van Den Berg P, et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood

- levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics* (Evanston).2009;124(1):350-357.
84. Jatana M, Singh I, Singh AK, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatric research*.2006;59(5):684-689.
85. Martini S, Austin T, Aceti A, Faldella G, Corvaglia L. Free radicals and neonatal encephalopathy: mechanisms of injury, biomarkers, and antioxidant treatment perspectives. *Pediatric research*.2020;87(5):823-833.
86. Benterud T, Ystgaard MB, Manueldas S, Pankratov L, Alfaro-Cervello C, Florholmen G, et al. N-Acetylcysteine amide exerts possible neuroprotective effects in newborn pigs after perinatal asphyxia. *Neonatology* (Basel, Switzerland).2017;111(1):12-21.
87. Kesidou E, Bitsina C, Chatzisotiriou A, Theotokis P, Dandi E, Tata DA, et al. N-Acetylcysteine administration attenuates sensorimotor impairments following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *IJMS*.2022;23(24).
88. Moss HG, Brown TR, Wiest DB, Jenkins DD. N-Acetylcysteine rapidly replenishes central nervous system glutathione measured via magnetic resonance spectroscopy in human neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*.2018;38(6):950-958.
89. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (Oxford, England).2006;8(4):315-317.
90. Kabatas S, Civelek E, Savrunlu EC, Kaplan N, Boyalı O, Diren F, et al. Feasibility of allogeneic mesenchymal stem cells in pediatric hypoxic-ischemic encephalopathy: Phase I study. *World journal of stem cells*.2021;13(5):470-484.

91. Liao Y, Cotten M, Tan S, Kurtzberg J, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone marrow transplantation (Basingstoke)*. 2013;48(7):890-900.
92. Serrenho I, Rosado M, Dinis A, M. Cardoso C, Grãos M, Manadas B, et al. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review of preclinical studies. *IJMS*. 2021;22(6).
93. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(5):973-979.e1.
94. Ahn SY, Chang YS, Sung DK, Sung SI, Park WS. Hypothermia broadens the therapeutic time window of mesenchymal stem cell transplantation for severe neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Sci Rep*. 2018;8(1).
95. Gonzales-Portillo GS, Reyes S, Aguirre D, Pabon MM, Borlongan CV. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Frontiers in Neurology*. 2014;5:147.
96. Herz J, Köster C, Reinboth BS, Dzierko M, Hansen W, Sabir H, et al. Interaction between hypothermia and delayed mesenchymal stem cell therapy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain, behavior, and immunity*. 2018;70:118-130.
97. Van Velthoven CTJ, Kavelaars A, Van Bel F, Heijnen CJ. Nasal administration of stem cells: a promising novel route to treat neonatal ischemic brain damage. *Pediatric research*. 2010;68(5):419-422.
98. Van Velthoven CTJ, Gonzalez F, Vexler ZS, Ferriero DM. Stem cells for neonatal stroke- the future is here. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:207.
99. Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, Hall AC, Lieb WR. How does xenon produce anaesthesia? *Nature*. 1998; (396)324.
100. McAdams RM, Juul, SE. Neonatal encephalopathy. *Clinics in perinatology*. 2016;43(3):485-500.

101. Dingley J, Tooley J, Liu X, Scull-Brown E, Elstad M, Chakkarapani E, et al. Xenon ventilation during therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy: a feasibility study. *Pediatrics (Evanston)*.2014;133(5):809-818.
102. Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, et al. Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Annals of neurology*.2005;58(2):182-193.
103. de Rossi L, Brueckmann M, Rex S, Barderschneider M, Buhre W, Rossaint R. Xenon and isoflurane differentially modulate lipopolysaccharide-induced activation of the nuclear transcription factor KB and production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in monocytes. *Anesthesia and analgesia*.2004;98(4):1007-1012.
104. Amer AR, Oorschot DE. Xenon combined with hypothermia in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a noble gas, a noble mission. *Pediatric neurology*.2018;84:5-10.
105. Maze M, Laitio T. Neuroprotective properties of xenon. *Mol Neurobiol*.2020;57(1):118-124.
106. Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and xenon: Novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *Journal of neuroscience research*.2013;91(4):473-478.
107. Dingley J, Tooley J, Porter H, Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *stroke*.2006;37(2):501-506.
108. Hobbs C, Thoresen M, Tucker A, Aquilina K, Chakkarapani E, Dingley J. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *stroke*.2008;39(4):1307-1313.
109. Yang T, Zhuang L, Rei Fidalgo AM, Petrides E, Terrando N, Wu X, et al. Xenon and sevoflurane provide analgesia during labor and fetal brain protection in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *PLoS ONE*.2012;7(5): e37020.

110. Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl A, et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*.2015;15(2):145.
111. Sabir H, Osredkar D, Maes E, Wood T, Thoresen M. Xenon combined with therapeutic hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia in neonatal rats. *PLoS ONE*.2016;11(6).
112. Schultz MJ, Determann RM, Juffermans NP. Ventilator-associated pneumonia prevention: WHAP, positive end-expiratory pressure, or both? *Critical Care Medicine*.2008;36(8):2441.
113. Istaphanous GK, Loepke AW. General anesthetics and the developing brain. *Current opinion in anaesthesiology*.2009;22(3):368-373.
114. Chakkarapani E, Thoresen M, Hobbs CE, Aquilina K, Liu X, Dingley J. A Closed-circuit neonatal xenon delivery system: a technical and practical neuroprotection feasibility study in newborn pigs. *Anesthesia and analgesia*.2009;109(2):451-460.
115. El-Dib M, Soul JS. The use of phenobarbital and other anti-seizure drugs in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med*.2017;22(5):321-327.
116. Solevåg AL, Schmörlzer GM, Cheung P-. Novel interventions to reduce oxidative-stress related brain injury in neonatal asphyxia. *Free Radic Biol Med*.2019; 142:113-122.
117. Liu Y, Barks JD, Xu G, Silverstein FS. Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke*.2004;35(6):1460-1465.
118. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, et al. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia–ischemia in newborn piglets. *Brain research*.2005;1058(1):129-136.
119. Filippi L, la Marca G, Fiorini P, Poggi C, Cavallaro G, Malvagia S, et al. Topiramate concentrations in neonates treated with prolonged whole body

- hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy. *Epilepsia* (Copenhagen).2009;50(11):2355-2361.
120. Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. *Semin Fetal Neonatal Med*.2010;15(5):293-298.
121. Filippi L, Poggi C, la Marca G, Furlanetto S, Fiorini P, Cavallaro G, et al. Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *The Journal of pediatrics*.2010;157(3):361-366.
122. Filippi L, Fiorini P, Daniotti M, Catarzi S, Savelli S, Fonda C, et al. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(8):973-980.
123. Nuñez-Ramiro A, Benavente-Fernández I, Valverde E, Cordeiro M, Blanco D, Boix H, et al. Topiramate plus cooling for hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized, controlled, multicenter, double-blinded trial. *Neonatology* (Basel, Switzerland).2019;116(1):76-84.
124. Marques MR, Garcia-robles A, Usach I, Vento M, Poveda JL, Peris JE, et al. Topiramate pharmacokinetics in neonates undergoing therapeutic hypothermia and proposal of an optimised dosing schedule. *Acta Paediatr*.2019;109(2):300.
125. Zhou KQ, Dhillon SK, Bennet L, Gunn AJ, Davidson JO. Targeting persistent neuroinflammation after hypoxic-ischemic encephalopathy—Is exendin-4 the answer? *International journal of molecular sciences*.2022;23(17):10191.
126. Lingam I, Meehan C, Avdic-Belltheus A, Martinello K, Hristova M, Kaynezhad P, et al. Short-term effects of early initiation of magnesium infusion combined with cooling after hypoxia–ischemia in term piglets. *Pediatr Res*.2019;86(6):699.
127. Galinsky R, Bennet L, Groenendaal F, Lear CA, Tan S, van Bel F, et al. Magnesium is not consistently neuroprotective for perinatal hypoxia-ischemia in term-equivalent models in preclinical studies: a systematic review. *Developmental neuroscience*.201436(2):73-82.

128. Rahman S, Canpolat F, Oncel M, Evli A, Dilmen U, Parappil H, et al. Multicenter randomized controlled trial of therapeutic hypothermia plus magnesium sulfate versus therapeutic hypothermia plus placebo in the management of term and near-term infants with hypoxic ischemic encephalopathy (The Mag Cool study): A pilot study. *Journal of clinical neonatology*.2015;4(3):158.
129. Gulczynska E, Gadzinowski J, Nowiczewski M, Sobolewska B, Caputa J, Maczko A, et al. Feasibility and safety of combining therapeutic hypothermia with magnesium sulfate administration, in the management of neonates with hypoxic ischemic encephalopathy - randomized control trial. *Neonatal and Pediatric Medicine*.2018;4(2).
130. Nair J, Kumar VHS. Current and emerging therapies in the management of hypoxic ischemic encephalopathy in neonates. *Children*.2018;5(7):99.
131. Tweel ERvd, van Bel F, Kavelaars A, Peeters-Scholte CM, Haumann J, Nijboer CH, et al. Long-term neuroprotection with 2-iminobiotin, an inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase, after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab*.2005;25(1):67-74.
132. Bjorkman ST, Ireland Z, Fan X, van der Wal WM, Roes KC, Colditz PB, Peeters-Scholte CM. Short-term dose-response characteristics of 2-iminobiotin immediately postinsult in the neonatal piglet after hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2013;44(3):809-11.
133. Zitta K, Peeters-Scholte C, Sommer L, Gruenewald M, Hummitzsch L, Parczany K, et al. 2-Iminobiotin superimposed on hypothermia protects human neuronal cells from hypoxia-induced cell damage: an in vitro study. *Frontiers in pharmacology*.2018;8:971.
134. Biselele T, Bambi J, Betukumesu DM, Ndiyo Y, Tabu G, Kapinga J, et al. A phase IIa clinical trial of 2-Iminobiotin for the treatment of birth asphyxia in DR Congo, a low-income country. *Pediatr Drugs*.2020;22(1):95-104.
135. Favié LMA, Peeters-Scholte, Cacha M P C D, Bakker A, Tjabbes H, Egberts TCG, van Bel F, et al. Pharmacokinetics and short-term safety of the selective

- NOS inhibitor 2-iminobiotin in asphyxiated neonates treated with therapeutic hypothermia. *Pediatric research*.2020;87(4):689-696.
136. Volbracht C, Van Beek J, Zhu C, Blomgren K, Leist M. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *The European journal of neuroscience*.2006;23(10):2611-2622.
137. Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of neuroscience*.1992;12(11):4427-4436.
138. Liu C, Lin N, Wu B, Qiu Y. Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic-ischemic brain injury. *Brain research*.2009;1282:173-182.
139. Landucci E, Filippi L, Gerace E, Catarzi S, Guerrini R, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of topiramate and memantine in combination with hypothermia in hypoxic-ischemic brain injury in vitro and in vivo. *Neuroscience letters*.2018;668:103-107.
140. Paternoster S, Falasca M. Dissecting the physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1. *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*.2018;9:584.
141. Rocha-Ferreira E, Poupon L, Zelco A, Leverin A, Nair S, Jonsdotter A, et al. Neuroprotective exendin-4 enhances hypothermia therapy in a model of hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Brain*.2018;141(10):2925-2942.
142. Jia X, Ye-Tian, Yuan-Li, Zhang G, Liu Z, Di Z, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, protects against amyloid- β peptide-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Physiol Behav*.2016;159:72-79.
143. Shibuta S, Varathan S, Kamibayashi T, Mashimo T. Small temperature variations alter edaravone-induced neuroprotection of cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes. *Br J Anaesth*.2010;104(1):52-58.
144. Yu H, Wu Z, Wang X, Gao C, Liu R, Kang F, et al. Protective effects of combined treatment with mild hypothermia and edaravone against cerebral

- ischemia/reperfusion injury via oxidative stress and Nrf2 pathway regulation. *International journal of oncology*.2020;57(2):500-508.
145. Yamato SH, Nakamura S, Htun Y, Nakamura M, Jinnai W, Nakao Y, et al. Intravenous edaravone plus therapeutic hypothermia offers limited neuroprotection in the hypoxic-ischaemic newborn piglet. *Neonatology*. 2020;117(6):713-720.
146. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *BioMed Research International*.2014;2014:757461-11.
147. Zhao L, O'Neill K, Diaz Brinton R. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Research Reviews*.2005;49(3):472-493.
148. Toro-Urrego N, Vesga-Jiménez DJ, Herrera MI, Luaces JP, Capani F. Neuroprotective role of hypothermia in hypoxic-ischemic brain injury: combined therapies using estrogen. *Current Neuropharmacology*.2019;17(9):874-890.
149. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*.2011;12(3):1533-1562.
150. Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang Y, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, et al. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *Journal of neurosurgery*.1997;87(5):724-730.
151. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*.2009;29(8):1359-1372.
152. Oh JS, Kim SW, Cho HJ, Kyong YY, Oh YM, Choi SM, et al. Combination treatment with 17 β -estradiol and therapeutic hypothermia for transient global cerebral ischemia in rats. *The American journal of emergency medicine*.2013;31(1):154-160.

153. Zhao H, Mitchell S, Koumpa S, Cui YT, Lian Q, Hagberg H, Johnson MR, Takata M, Ma D. Heme oxygenase-1 mediates neuroprotection conferred by argon in combination with hypothermia in neonatal hypoxia-ischemia brain injury. *Anesthesiology*.2016;125(1):180-92.
154. Alderliesten T, Favie LMA, Neijzen RW, Auwärter V, Nijboer CHA, Marges REJ, et al. Neuroprotection by argon ventilation after perinatal asphyxia: a safety study in newborn piglets. *PLoS ONE*.2014;9(12): e113575.
155. Broad KD, Fierens I, Fleiss B, Rocha-Ferreira E, Ezzati M, Hassell J, et al. Inhaled 45–50% argon augments hypothermic brain protection in a piglet model of perinatal asphyxia. *Neurobiology of disease*.2016;87:29-38.
156. Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia–ischemia rat model. *Neuroscience letters*.2008;441(2):167-172.
157. Matchett GA, Fathali N, Hasegawa Y, Jadhav V, Ostrowski RP, Martin RD, et al. Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia–ischemia rat models. *Brain research*.2009;1259:90-97.
158. Nemeth J, Toth-Szuki V, Varga V, Kovacs V, Remzso G, Domoki F. Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Physiol Pharmacol*.2016;67(5):677-689.
159. Htun Y, Nakamura S, Nakao Y, Mitsuie T, Nakamura M, Yamato S, et al. Hydrogen ventilation combined with mild hypothermia improves short-term neurological outcomes in a 5-day neonatal hypoxia-ischaemia piglet model. *Sci Rep*.2019;9(1).
160. Htun Y, Nakamura S, Kusaka T. Hydrogen and therapeutic gases for neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy: potential neuroprotective adjuncts in translational research. *Pediatr Res*.2020;89(4):753.
161. Lewis SR, Nicholson A, Smith AF, Alderson P, Lewis SR. Alpha-2 adrenergic agonists for the prevention of shivering following general anaesthesia. *Cochrane database of systematic reviews*.2015;2015(8):CD011107.

162. Baserga M, DuPont TL, Ostrander B, Minton S, Sheffield M, Balch AH, et al. Dexmedetomidine Use in Infants Undergoing Cooling Due to Neonatal Encephalopathy (DICE Trial): A Randomized Controlled Trial: Background, Aims and Study Protocol. *Frontiers in Pain Research*.2021;2:770511.
163. O'Mara K, Weiss MD. Dexmedetomidine for sedation of neonates with HIE undergoing therapeutic hypothermia: a single-center experience. *AJP Rep*. 2018;8(3): e168-e173.
164. Naveed M, Bondi DS, Shah PA. Dexmedetomidine versus fentanyl for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy undergoing therapeutic hypothermia. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics*.2022;27(4):352-357.
165. Gao Y, Zhang Y, Dong Y, Wu X, Liu H. Dexmedetomidine mediates neuroglobin up-regulation and alleviates the hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting neuronal apoptosis in developing rats. *Frontiers in pharmacology*.2020;11:555532.
166. Ren X, Ma H, Zuo Z. Dexmedetomidine postconditioning reduces brain injury after brain hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Neuroimmune Pharmacol*.2016;11(2):238-247.
167. Paris A, Mantz J, Tonner PH, Hein L, Brede M, Gressens P. The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the α 2A-adrenoceptor subtype. *Anesthesia and analgesia*.2006;102(2):456-461.
168. McAdams RM, Pak D, Lalovic B, Phillips B, Shen DD. Dexmedetomidine pharmacokinetics in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy receiving hypothermia. *Anesthesiology Research and Practice*. 2020; 2020:2582965.
169. Roumes H, Dumont U, Sanchez S, Mazuel L, Blanc J, Raffard G, et al. Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*.2020;41(2):342.

170. Tectorou K, Sisa C, Iqbal A, Dhillon K, Hristova M. Current therapies for neonatal hypoxic–ischaemic and infection-sensitised hypoxic–ischaemic brain damage. *Frontiers in synaptic neuroscience*.2021;13:709301.
171. Mirza MA, Ritzel R, Xu Y, Mccullough LD, Liu F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation*.2015;12(1).
172. Demarest TG, Schuh RA, Waddell J, Mckenna MC, Fiskum G. Sex-dependent mitochondrial respiratory impairment and oxidative stress in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurochem*.2016;137(5):714.
173. Al Mamun A, Yu H, Romana S, Liu F. Inflammatory responses are sex specific in chronic hypoxic–Ischemic encephalopathy. *Cell Transplantation*.2018;27(9):1328-1339.

ANEXO I: DISEÑO DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

	Diseño	Intervención	Estado de reclutamiento (n)	Medidas de Resultado Primarias
Eritropoyetina NCT01378273	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. 6 dosis de EPO 1000 U/kg iv cada 48 horas + EPO 400 U/kg vía subcutánea (sq) 3 veces por semana hasta las 32+6 semanas 2. Placebo: salino iv y subcutánea	Completo (941)	Muerte o deterioro grave del desarrollo neurológico a los 22-26 meses de edad.
Eritropoyetina NCT02811263	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. EPO 1000 U/kg iv a los 1,2,3,4 y 7 días de edad 2. Placebo: salino iv	Completo (500)	Muerte o deterioro del desarrollo neurológico a los 22-36 meses de edad.
Eritropoyetina NCT01732146	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento triple Controlado con placebo	1. EPO 1000-1500 U/kg iv 3 dosis cada 24 horas 2. Placebo: salino 0,2 ml iv	Completo (120)	Supervivencia sin secuelas neurológicas a los 24 meses
Eritropoyetina NCT03079167	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. EPO 1000 U/kg iv a los 1,2,3,5 y 7 días de edad 2. Placebo: salino (0,9% NaCl) iv	Activo no reclutando (313)	Muerte o discapacidad moderada/grave a los 2 años de edad
Darbepoetin + Hipotermia NCT01471015	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento triple Controlado con placebo	1. Darbepoetin 10 mcg/kg 2 dosis, a las 12 horas postparto iv y a los 7 días iv o sq + hipotermia 2. Darbepoetin 2 mcg/kg + hipotermia 3. Placebo + hipotermia	Completo (30)	El perfil farmacocinético de la Darbepoetina combinado con la hipotermia

	Diseño	Intervención	Estado de reclutamiento (n)	Medidas de Resultado Primarias
Cannabidiol + Hipotermia EudraNCT: 2016-000936-17	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento doble Controlado con placebo	1. GWP42003-P 0,1 mg/kg dosis única iv de 15 minutos de duración + hipotermia dentro de las 18 horas tras el parto 2. GWP42003-P 0,3 mg/kg + hipotermia 3. GWP42003-P 1,0mg/kg + hipotermia 4. Placebo + hipotermia	Completo (13)	Evaluar la seguridad y la tolerabilidad
Alopurinol NCT00189007	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. Alopurinol 500 mg/50mL agua dosis única iv 2. Placebo: manitol 500 mg/50mL agua iv	Desconocido (222)	Producción de radicales libres y marcadores de daño neuronal
Alopurinol + Hipotermia NCT03162653	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. Alopurinol 20 mg/kg en 2 ml/kg de agua estéril al nacimiento + 10 mg/kg en 1 ml/kg 12 horas después + hipotermia 2. Placebo: manitol 20 mg/kg + hipotermia	Reclutando (846)	Muerte o deterioro grave del desarrollo neurológico a los 24 meses de edad
Células madre + Hipotermia NCT02612155	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento cuádruple Controlado con placebo	1. 2 infusiones de sangre de cordón umbilical autóloga 2. Placebo: 2 infusiones de placebo (mezcla de glóbulos rojos autólogos y plasma)	Completo (35)	Supervivencia y deterioro del desarrollo neurológico al año
Xenón + Hipotermia NCT00934700	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento simple Controlado con terapia estándar	1. Inhalación de gas xenón 30% durante 24 horas + hipotermia durante 72 horas con inicio a las 6 horas posterior al parto. 2. Hipotermia	Completo (92)	Relación lactato/N-acetil-aspartato en espectroscopia de resonancia magnética a los 10 días

	Diseño	Intervención	Estado de reclutamiento (n)	Medidas de Resultado Primarias
Xenón + Hipotermia NCT02071394	Aleatorizado Asignación paralela Ensayo abierto Controlado con terapia estándar	1. Inhalación de gas xenón al 50% durante 18 horas a las 5 horas postparto + hipotermia 33,5°C durante 72 horas a las 3 horas posteriores al nacimiento. 2. Hipotermia	Completo (50)	Muerte y discapacidad moderada-grave
Topiramato + Hipotermia NCT01241019	Multicéntrico Aleatorizado Asignación paralela Enmascaramiento simple Controlado con terapia estándar	1. Topiramato 10 mg/kg 3 dosis cada 24 horas por sonda nasogástrica + hipotermia 2. Hipotermia	Completo (64)	Desarrollo neurológico a los 6, 12 y 18 meses
2-Iminobiotin NCT01626924	Multicéntrico No aleatorizado Ensayo abierto No controlado	1. 2-Iminobiotin 6 dosis de 0,2 mg/kg cada 4 horas	Completo (6)	Cociente lactato/N-acetil-aspartato en los ganglios basales medido por espectroscopía de RMN. Supervivencia a las 48 horas con EEG normal
2-Iminobiotin + Hipotermia EudraNCT: 2014-004265-25	Centro único Ensayo abierto No controlado	1. 2-Iminobiotin 4 dosis de 0,16 mg/kg iv cada 6 horas dentro de las 12 horas tras el parto+ hipotermia 2. 2-Iminobiotin 4 dosis de 0,08 mg/kg iv cada 6 horas dentro de las 12 horas tras el parto + hipotermia	Completo (12)	Seguridad a corto plazo y tolerabilidad