



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

USO DE SILDENAFIL EN COBAYAS GESTANTES Y SU EFECTO SOBRE EL
CRECIMIENTO UTERINO, DESARROLLO FETAL Y TOLERANCIA A LA ASFIXIA EN
FETOS EVALUADA A TRAVÉS DE GASOMETRÍA SANGUÍNEA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

Pedro Sánchez Aparicio

Tutor Principal:

Dr. Daniel Mota Rojas

Comité Tutorial:

Dr. Alejandro Nava Ocampo

Dra. María Elena Trujillo Ortega

México D. F.,

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El autor de la presente, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante dos años, con el número de registro 193059.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Héctor Sumano López

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Dr. Carlos Gutiérrez Olvera

Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Dr. Alejandro Nava Ocampo

Division of Clinical Pharmacology & Toxicology, The Hospital for Sick Children, and
President of PharmaReasons, Toronto ON, Canada.

Dr. Daniel Mota Rojas

Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área: Ecodesarrollo de la Producción
Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
Laboratorio de Etología y Producción Porcina. México, D.F.

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Departamento de Medicina Animal y Producción: Cerdos, Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

ASESORES DE TESIS

Dr. Daniel Mota Rojas

Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área: Ecodesarrollo de la Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
Laboratorio de Etología y Producción Porcina. México, D.F.

Dr. Alejandro Nava Ocampo

Division of Clinical Pharmacology & Toxicology, The Hospital for Sick Children, and
President of PharmaReasons, Toronto ON, Canada.

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Departamento de Medicina Animal y Producción: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Dra. Dina Villanueva García

Jefa del Departamento de Neonatología.
Hospital Infantil de México, Federico Gómez. México, D.F.

Dra. María de Lourdes Alonso Spilsbury

Líder del Cuerpo Académico de Etología, Producción Porcina y Fauna Silvestre
Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área: Ecodesarrollo de la Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D.F.

Dr. Emilio Arch Tirado

Jefe del Laboratorio de Bioacústica, Instituto Nacional de Rehabilitación. México, D.F.

Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez

Jefe del Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Rehabilitación. México,
D.F.

DEDICATORIA

Doy crédito a los miembros de mi familia, especialmente a mi Papá Pedro Trinidad Sánchez así como también a mi esposa Lorena Jiménez, que durante algún tiempo han tolerado algunas noches de monotonía y fines de semana en silencio.

AGRADECIMIENTOS

El autor de esta tesis expresa su profundo agradecimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto sus puertas y recibirme día con día.

Deseo Agradecer al Laboratorio de Etología y Producción Porcina: Dr. Ramiro Ramírez, Dra. Marilú Alonso Spilsbury, Dr. Daniel Mota Rojas, M. en C. Isabel Escobar, M. en C. Silvia Adriana Olmos, M. en C. Miguel González, M.V.Z. Bárbara Acosta, M.V.Z. Daniela Reyes, M. V. Z. Héctor Orozco por permitirme trabajar en este importante grupo de trabajo y por su valiosa colaboración en la ejecución del proyecto.

Específicamente deseo reconocerles al Dr. Daniel Mota y a la Dra. Marilú Alonso Spilsbury, su colaboración en la realización experimental y por el apoyo intelectual, social, moral y económico para lograr el desarrollo y la culminación de esta tesis, también por la revisión exhaustiva y detallada del material que esta impreso en sus manos.

A su vez, quiero agradecer la valiosa e importante aportación y cooperación de cada una de las siguientes personalidades que intervinieron en distintas etapas del proceso de desarrollo y ejecución de este proyecto:

Dr. Alejandro Nava, de la Division of Clinical Pharmacology & Toxicology, The Hospital for Sick Children, y Presidente de Pharma Reasons, Toronto ON, Canadá, por la elaboración del diseño general y por su valioso aporte en el análisis estadístico.

Dr. Rafael Hernández, Jefe del Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, por su aportación en el diseño y desarrollo experimental, y por la contribución de conocimientos acerca del uso y manejo de animales de laboratorio.

Dr. Emilio Arch y M. en C. Antonio Verduzco, Jefe y Responsable respectivamente del Laboratorio de Bioacústica, Instituto Nacional de Rehabilitación por haber permitido el acceso a las Instalaciones y por sus aportaciones, interés y constante apoyo en las actividades experimentales.

Dra. Dina Villanueva, Jefa de la División de Neonatología del Hospital Infantil Federico Gómez por haber proporcionado la idea original y por las observaciones oportunas y preguntas conducentes a la reflexión y corrección.

Dra. Ma. Elena Trujillo, Jefa de Planeación en la FMVZ, UNAM por sus acertadas aportaciones, comentarios y por la revisión absoluta y puntualizada de esta tesis.

Dr. Alfonso Alfaro y Dra. Rebeca Uribe, Jefe y Responsable respectivamente del Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Rehabilitación, por su valiosa cooperación y por haber permitido usar este espacio para realizar las cirugías de los animales utilizados en este experimento.

DATOS BIOGRÁFICOS

Pedro Sánchez Aparicio

Estudiante del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Realizó la Licenciatura en Medicina Veterinaria Zootecnia en el periodo 2000-2004 en la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D. F.

Ha colaborado en proyectos de investigación realizados en el Laboratorio de Etología y Producción Porcina, del Dpto. de Producción Agrícola y Animal en la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D. F. relacionados con Bioquímica, Ciencia de la Carne y Perinatología Animal en modelos animales.

Ha sido conferencista en diferentes Congresos: la IV Jornada Internacional en Producción Porcina, diferentes Congresos Nacionales realizados por la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, la 1^{ra} Reunión Nacional en “Perinatología Animal: Enfoques clínicos y Experimentales y la Semana Universitaria de “Perinatología Animal en Monogástricos”.

Es co-autor de 4 capítulos en el libro de Perinatología Animal: Enfoques clínicos y experimentales. Así mismo, es co-autor del libro Efecto del Transporte, Ayuno y Periodo de Reposo Pre-Sacrificio en la Calidad de la Canal Porcina.

Es co-autor de 5 artículos científicos arbitrados y 5 artículos de divulgación relacionados con aspectos de reproducción animal, ciencia de la carne y asfixia perinatal en neonatos, fetos y cobayos.

Actualmente es aspirante al Doctorado en Ciencias con la línea de investigación Uso de prostaglandinas para la inducción del parto y su efecto sobre la supervivencia neonatal.

C O N T E N I D O

LISTA DE CUADROS, TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES.....	14
1. Fisiopatología de la Asfixia Perinatal.....	14
1.1. Asfixia perinatal.....	16
1.2. Fisiopatología de la asfixia fetal y neonatal.....	17
1.2.1. Secuelas de la asfixia.....	19
1.2.2. Cambios circulatorios.....	19
1.2.3. Liberación de catecolaminas y metabolismo energético.....	21
1.3. Acidosis metabólica.....	22
1.3.1. Daño cerebral.....	26
2. El cobayo (<i>Cavia porcellus</i>) como modelo experimental de desarrollo uterino, crecimiento fetal, asfixia perinatal y dilatación vascular pulmonar.....	28
2.1. El cobayo en la investigación científica de asfixia perinatal inducida.....	29
2.1.1. Asfixia perinatal natural e inducida; efectos adversos a nivel de SNC.....	32
2.2. Restricción de crecimiento fetal intrauterino.....	36
2.3. Uso de citrato de sildenafil y su efecto sobre el sistema materno-fetal en mujeres y modelos animales.....	38
2.4. Uso de citrato de sildenafil y su efecto sobre el sistema pulmonar en humanos y animales de laboratorio.....	42
3. Equilibrio ácido base en el recién nacido asfíctico; aspectos relevantes de la gasometría sanguínea en humanos, cobayos y ratas.....	46
3.1. Gasometría sanguínea de cordón umbilical en neonatos.....	46
3.2. Importancia de la gasometría en perinatología.....	48
3.3. Obtención de gases en sangre.....	49
3.4. Desequilibrio ácido-base y perfil metabólico del recién nacido.....	50
3.4.1. Alternativas para restablecer el equilibrio ácido base en el recién nacido con asfixia.....	53
III. OBJETIVOS.....	55
General.....	55
Específicos.....	55
IV. HIPOTESIS.....	56
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1. Tipo de animales y localización.....	57
1.1. Condiciones de alojamiento.....	57
1.2. Número de animales y formación de grupos.....	57
2. Tratamiento.....	58
3. Cesárea.....	58
3.1. Inducción de la asfixia y muestreo sanguíneo.....	59
4. Zoometría y morfometría.....	60

5. Variables observadas	61
6. Análisis estadísticos	61
VI. RESULTADOS.....	63
VII. DISCUSIÓN.....	68
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. REFERENCIAS.....	73
X. FIGURAS.....	89
XI. FOTOGRAFÍAS.....	91
XII. ANEXOS.....	95
1) Artículos aceptados derivados del proyecto de tesis.....	95
1.1) A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and preterm labor.....	95
Summary.....	95
Introduction	96
Method.....	97
Results	98
Discussion	99
References.....	101
1.2) Systemic Effects of Sildenafil Citrate on Pregnancy and Perinatal Periods	107
Abstract.....	107
Introduction	108
Therapeutic applications of sildenafil.....	110
Cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury	111
Persistent pulmonary hypertension of the newborn.....	113
Mortality	113
References.....	114
2) Cartas de aceptación de Artículos aceptados.....	117
3) Formato para registrar indicadores y variables durante y después de la cesárea en cobayos.....	119

LISTA DE CUADROS, TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS

Cuadros	Páginas
Cuadro 1. Indicadores reproductivos del cobayo y la rata.....	34
Cuadro 2 Parámetros somatométricos de cobayos al nacimiento expuestos a los efectos maternos por ingesta de sildenafil.....	70
Cuadro 3 Efecto del sildenafil sobre el peso de los órganos sólidos y de la placenta de fetos extraídos por cesárea.....	70
Cuadro 4. Parámetros metabólicos y desequilibrio acido-base de fetos a término expuestos a asfixia perinatal inducida.....	71
Cuadro 5. Efecto del uso de Sildenafil sobre indicadores de vitalidad en fetos sometidos a asfixia perinatal inducida.....	72
Cuadro 6. Efecto del uso de Sildenafil sobre los indicadores reproductivos de las cobayas a la cesárea.....	72
TABLAS	
Table 1 <i>In vitro</i> reproductive-related effects of sildenafil.....	109
Table 2 Reproductive-related effects of sildenafil evaluated <i>in vivo</i> in experimental animal models.....	110
Table 3 Reproductive-related effects of sildenafil in women.....	111
FIGURAS	
Figura 1. Fisiopatología de la muerte fetal por asfixia.	94
Figura 2.- Evolución del proceso de patogénesis de hipoxia-isquémia del feto... ..	95
ESQUEMAS	
Esquema 1.- Representación general de la metodología empleada antes, durante y después de la cesárea en cobayas.....	67

R E S U M E N

El objetivo del estudio fue determinar si el citrato de sildenafil incrementa el peso fetal y favorece la tolerancia a la asfixia perinatal inducida en fetos extraídos por cesárea. Se utilizaron 20 cobayas gestantes que fueron asignadas aleatoriamente a los diferentes grupos: en el grupo 1 o testigo (n=10) los animales recibieron solución salina estéril, mientras que los grupos 2 (n=5) y 3 (n=5) recibieron sildenafil 50 µg/kg (n= 5) y 500 µg/kg (n= 5) respectivamente. La dosis fue administrada por vía oral a las cobayas desde del día 35 de gestación hasta el día de la cesárea. Inmediatamente después de la extracción del feto de la cavidad uterina, se obtuvo el primer muestreo sanguíneo por punción cardíaca. La muestra de sangre se transfirió a un micro-capilar heparinizado (150-µl) y se analizó a través del equipo de gasometría GEM premier 3000. Después del muestreo sanguíneo, la asfixia perinatal se indujo por compresión del cordón umbilical durante 5 minutos. Previo a la descompresión del cordón umbilical, se realizó un segundo muestreo sanguíneo. Los fetos obtenidos de madres tratadas con 500 µg/kg sildenafil fueron 1.5 veces más pesados ($P<0.001$) y más largos ($P=0.004$) que los fetos obtenidos de los otros dos grupos. El peso del corazón y pulmones fueron significativamente mayores ($P<0.05$) en el grupo con dosis alta de sildenafil (500 µg/kg) respecto al grupo testigo. En contraste, no hubo diferencias de estos pesos entre el grupo testigo y el grupo con dosis baja de sildenafil. El 20% de los fetos en el grupo testigo, no sobrevivieron a la asfixia perinatal inducida, a diferencia de estos resultados, no fue observada ninguna muerte en los grupos tratados con el fármaco. De acuerdo a la gasometría sanguínea y los electrolitos, las crías de madres tratadas con sildenafil 500 µg/kg tuvieron mayor tolerancia a la asfixia que los fetos a término obtenidos de madres incluidas en el grupo testigo y de fetos extraídos de madres que recibieron una dosis de sildenafil de 50 µg/kg. En conclusión, la administración de 500 µg/kg de sildenafil a cobayas desde el día 35 hasta el día de la cesárea resulta en un incremento del crecimiento fetal y de la tolerancia a la asfixia perinatal inducida. Los dos grupos tratados con sildenafil mostraron mejor desarrollo fetal respecto a los fetos del grupo testigo.

Palabras clave: peso fetal, crecimiento de órganos fetales, asfixia, cobayo, sildenafil.

A B S T R A C T

Our aim was to determine whether sildenafil increases fetal weight and favors fetal tolerance to induced asphyxia in guinea-pig fetuses delivered by cesarean section. Twenty pregnant sows were randomly allocated to receive a) placebo (group 1; n= 10), b) sildenafil 50 µg/kg (groups 2; n=5), or c) sildenafil 500 µg/kg (group 3; n= 5), starting from day 35 of gestation to delivery. The tablets of sildenafil were crushed and diluted with sterile saline solution in a 50-ml Erlenmeyer flask. The proper volumes were administered orally every day to the animals until day of the cesarean section. Animals underwent cesarean sections. Immediately after the extraction of the piglet from the uterine cavity, a 1-ml blood sample was obtained by cardiac puncture. The blood sample was transferred to a 150-µl heparinized micro-capillary tube and was analyzed by a gasometer (GEM premier 3000). After blood sampling, perinatal asphyxia was induced by clamping the umbilical cord by an occluder cuff for a period of 5 min. In the last minute of induced asphyxia, a second blood sample was obtained. The fetuses extracted of mothers treated with 500 µg/kg sildenafil were 1.5 times heavier and significantly larger than piglets obtained of the other two groups. The weight of heart and lungs were significantly higher ($P<0.05$) in the high-dose sildenafil group than in the control animals but there were no differences in the weights between controls and the low-dose sildenafil group. In the control group, approximately 20% of piglets did not survive the induced asphyxia whereas none died in the treated groups. As judged by blood gases and serum electrolytes of surviving guinea piglets, the offspring of mothers treated with the high dose of sildenafil (500 µg/kg) had a better tolerance to asphyxia than piglets born to control animals as well as those born to mothers receiving a lower dose of sildenafil (50 µg/kg). In conclusion, sildenafil 500 µg/kg administered from day 35 to the day of the cesarean section in guinea pigs resulted in an enhanced fetal growth and a better tolerability to induced intrapartum asphyxia than sildenafil 50 µg/kg; both treatments resulted in better fetal outcomes compared with controls.

Key words: fetal body weight, fetal organ growth, asphyxia, guinea pig, sildenafil.

I. INTRODUCCIÓN

En medicina humana, en el área de perinatología las complicaciones del parto juegan un papel importante como causa de hipoxia y sufrimiento fetal, el cual produce una alteración metabólica compleja debida a una disminución del intercambio feto-materno, de evolución relativamente rápida, que lleva a una disfunción de la homeostasis fetal y puede conducir a disfunción orgánica grave o a la muerte fetal (Schwarcz *et al.*, 1995).

La asfixia perinatal es una de las principales preocupaciones en salud mundial debido a las complicaciones y graves secuelas que se presentan si el neonato sobrevive al evento de asfixia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el mundo, entre 4 y 9 millones de recién nacidos presentan asfixia cada año. De estos aproximadamente 1.2 millones muere y casi el mismo número presentará secuelas graves (OMS, 1998). La OMS también estima que el 29% de la mortalidad en el mundo es secundario a asfixia al nacimiento (State of the World's Newborns, 2001).

La disminución en el intercambio gaseoso materno-fetal secundario a asfixia perinatal puede ser ocasionado por distintas causas que acontecen durante el embarazo, trabajo de parto y después del nacimiento, por ejemplo; interrupción de la circulación sanguínea umbilical, alteración del intercambio de sangre placentaria, inadecuada perfusión del lado materno de la placenta, alteración de la oxigenación materna, e incapacidad del neonato para ejercer una adecuada insuflación del pulmón y una adecuada transición de la circulación fetal a la neonatal (Mota-Rojas *et al.*, 2006; Orozco-Gregorio *et al.*, 2006a).

La asfixia afecta todos los órganos y sistemas en diverso grados según la intensidad y duración. Es en el sistema nervioso central se produce la lesión mas relevante, por sus consecuencias en cuanto a mortalidad y secuelas. La gran mayoría de las causas de asfixia perinatal son de origen intrauterino. Aproximadamente el 5% ocurre antes del inicio del trabajo de parto, 85% durante el parto y el 10% restante durante el período neonatal (Volpe, 2001).

Una de las mayores causas de muerte perinatal es la prematuridad (Norman *et al.*, 1999). No obstante, la compresión del cordón umbilical y la prevención del trabajo de parto prematuro continúan siendo las principales metas de la investigación en el área de obstetricia. Como resultado de una compresión en el cordón umbilical, ocurren cambios en la circulación pulmonar causando un incremento en la resistencia vascular pulmonar, alteración pulmonar en la reactividad vascular, e inducción vascular y remodelación cardíaca, estos cambios pueden ser prevenidos por inhibición selectiva de fosfodiesterasa (PDE) tipo 5 (Larrue *et al.*, 2005).

La sal citrato de sildenafil (Viagra) 1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine (Gobry *et al.*, 2000) está indicada en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE) (Edwards y Muirhead, 2002; Michelakis *et al.*, 2002; Muirhead *et al.*, 2002). En los últimos años, el citrato de sildenafil ha sido usado satisfactoriamente para el tratamiento de la DE (Khan *et al.*, 2004). Sin embargo, y desde la introducción del sildenafil en 1997, hasta hace algunos años, no se había evaluado su efecto en mujeres (Sher y Fisch, 2000; Sánchez-Aparicio *et al.*, 2006).

El citrato de sildenafil no ejerce un efecto relajante directo sobre el cuerpo cavernoso humano aislado, es un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 5 que aumenta el efecto vasodilatador del óxido nítrico (ON) evitando la degradación del segundo mensajero GMPc (Guanosin Monofosfato cíclico) (Ardeschir *et al.*, 2002; Michelakis *et al.*, 2002; Sher, 2002; Khan *et al.*, 2004), potencializando el efecto vascular del óxido nítrico en el músculo liso (Sher y Fisch, 2000; Sher, 2002), a nivel de cuerpo cavernoso (Gobry *et al.*, 2000; Muirhead *et al.*, 2002), miometrio humano normal (Khan *et al.*, 2004) o con restricción de crecimiento fetal (Wareing *et al.*, 2005) y pulmón (Shekerdemian *et al.*, 2004; Larrue *et al.*, 2005) dando inicio a una vaso relajación (Zoma *et al.*, 2004).

Recientemente, el citrato de sildenafil ha sido usado como un agente terapéutico por su efecto sobre el aumento de la vasodilatación de pequeñas arterias miometriales, disminución en la resistencia periférica con incremento del flujo sanguíneo útero-placenta y mejoría de la perfusión sistémica perinatal (Wareing *et al.*,

2005). La aplicación de citrato de sildenafil parece ser efectiva y con seguridad causaran inquietud las observaciones sobre los efectos en el sistema materno-fetal (Khan *et al.*, 2004).

Dada la importancia que se le ha brindado al estudio del citrato del sildenafil en los últimos años y la versatilidad en sus líneas de investigación, consideramos necesario evaluar una serie de determinaciones metabólicas que permitan evaluar y caracterizar de forma integral y más certera el proceso de asfixia *in utero* por el cual curso el modelo animal (cobayos fetos) de madres que fueron tratadas con citrato de sildenafil durante el tercer tercio de gestación. Los resultados de este estudio se consideran importantes ya que podríamos prevenir el proceso de asfixia y conocer si el fármaco causa efectos teratogenicos en los productos, permitiendo dar inicio a nuevos proyectos de investigación relacionados a la prevención del proceso de asfixia perinatal en algunas especies mamíferas susceptibles a este acontecimiento, de esta forma podríamos contribuir en el área de perinatología de animales y humanos a fin de mejorar la calidad y grado de supervivencia neonatal.

II. ANTECEDENTES

1. Fisiopatología de la Asfixia Perinatal

En la actualidad, resulta evidente que los fetos *in utero* están expuestos a diversos factores que provocan interrupción del paso de oxígeno a través del cordón umbilical, ocasionándoles asfixia con hipoxia y acidosis metabólica. A estos factores, se adicionan la duración del parto y susceptibilidad del cerebro a hipoxia.

En el presente capítulo, se revisan la fisiopatología de la asfixia durante la etapa de transición de feto a neonato que ocurre durante el proceso del parto, los indicadores para su evaluación, así como los mecanismos involucrados para compensar la disminución de la concentración de oxígeno. Los mecanismos fisiológicos que ocurren durante la asfixia en mamíferos neonatos de especies como el cobayo, cerdo e incluso el hombre, pueden presentar algunas similitudes (Arbay *et al.*, 1996; Singer, 1999); por tanto, es posible realizar comparaciones cautelosas de fetos y neonatos entre estas especies.

Los eventos comunes que acontecen durante el proceso de asfixia aguda tales como hipoxia y acidosis metabólica, afectan el bienestar del neonato y su desempeño postnatal ya que hay una consecuente disminución de la viabilidad (Orozco *et al.*, 2007; Trujillo-Ortega *et al.*, 2006). En este apartado se revisan diferentes indicadores de hipoxia y de viabilidad usados en humanos y que en algunos casos son empleados en otras especies animales usadas en laboratorios bajo condiciones controladas; por ejemplo, la escala de Apgar ampliamente utilizada en bebés podría ser una alternativa en el área de obstetricia animal. Por último, se analiza la patofisiología de la hipoxia en neonatos.

A pesar de los trabajos publicados, se requieren más estudios para monitorear el estrés fetal durante el parto, establecer la correlación entre los indicadores tradicionales de hipoxia y los métodos para cuantificar el vigor del neonato, como son la valoración del pulso cardiaco, latencia a intentos de inspiración, ritmo respiratorio, tono muscular, y otros parámetros que permitan en conjunto una mejor evaluación de

la hipoxia fetal y una ampliación en el conocimiento acerca del impacto de estos indicadores sobre la viabilidad del neonato (Mota-Rojas *et al.*, 2006).

En medicina humana, en el área de perinatología las complicaciones al parto como hipoxia y sufrimiento fetal juegan un papel importante ya que producen una alteración metabólica compleja debida a una disminución del intercambio gaseoso feto-materno, de evolución relativamente rápida que lleva a una disfunción de la homeostasis fetal y puede conducir a disfunción orgánica grave o a la muerte fetal (Schwarcz *et al.*, 1995). El proceso de asfixia fetal y neonatal que ocurre durante el proceso del parto, ha sido ampliamente evaluado en medicina humana (Lievaart y de Jong 1984; da Silva *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2001). Una de las principales causas de mortalidad perinatal en humanos es la asfixia intra-parto; el mejor método para evitarla es la interpretación de las señales del sufrimiento fetal y la intervención oportuna (Buchmann *et al.*, 2002).

En medicina veterinaria, el proceso de asfixia perinatal también ha sido objeto de diversas investigaciones donde los modelos experimentales por excelencia han sido el feto de neonato porcino y cobayo. Los estudios de investigación realizados en fetos y neonatos porcinos han proporcionado aportaciones relevantes a la medicina humana (Alward *et al.*, 1978; Randall, 1979), demostrando que la gran mayoría de las causas de asfixia perinatal son de origen intrauterino; aproximadamente el 5% ocurre antes del inicio del trabajo de parto, 85% durante el parto y el 10% restante durante el período neonatal (Volpe, 2001).

Es posible que varios sucesos tengan lugar en el periodo pre-parto y jueguen un papel importante en los fenómenos del post-parto inmediato. Cuando se prolonga y dificulta el proceso de parto, el neonato puede nacer en condiciones de hipoxia aunque aparentemente sano (Varley, 1995). La hipoxia *in utero* o durante el parto en modelo animal es producida por diversas causas incluyendo la compresión o ruptura temprana del cordón umbilical, las cuales representan una causa importante de mortalidad, debilidad y de pobre desarrollo (Mota *et al.*, 2005a). Independientemente de la causa que impide que el feto nazca, la asfixia durante el parto es un factor importante en la etiología de la mortalidad durante el proceso de parto, y un alto porcentaje se encuentra asociado a la anoxia (Mota *et al.*, 2002a).

El objetivo del presente apartado es revisar las secuelas de la hipoxia, la fisiopatología de la asfixia del feto y del neonato durante el proceso del parto, los indicadores para su evaluación, así como los mecanismos involucrados para compensar la disminución de la concentración de oxígeno.

1.1. Asfixia perinatal

El término perinatal puede ser usado para denotar diferentes períodos de gestación o para referirse al período en torno al tiempo de nacimiento. La asfixia resulta de una deficiencia de oxígeno o un exceso de bióxido de carbono que generalmente es causado por interrupción de la respiración y que origina inconsciencia (Gilstrap *et al.*, 1989). Este proceso puede ocurrir en la vida intrauterina, al momento del parto, o inmediatamente después de éste (Lacoius, 1987). Otros términos comúnmente empleados en el proceso de asfixia son los de hipoxia, definido como una baja concentración de oxígeno, así como el de isquemia, la cual se define como una disminución de la perfusión del riego sanguíneo a otro órgano.

Recientemente se ha puesto en duda si la hipoxia-isquemia perinatal es la causa primaria de la encefalopatía neonatal y parálisis cerebral. Estudios epidemiológicos importantes han sugerido una amplia gama de etiologías como: enfermedad tiroidea materna, anormalidades del sistema hemostático e inmune, corioamnionitis o evidencia clínica de alteración en el intercambio gaseoso intrauterino (Edwards y Azzopardi, 2000).

Una falla en el mecanismo que regula la respiración del neonato produce hipoxia e inicialmente la respiración se torna rápida y profunda, si este mecanismo compensatorio no es exitoso, el neonato experimentará apnea en 2 o 3 min (apnea primaria), presentando bradicardia y vasoconstricción en la piel, músculos, riñones e intestino, y redistribuyendo el flujo sanguíneo al corazón, cerebro y pulmones en un intento por preservar la concentración de oxígeno en los órganos vitales. Posterior a la apnea primaria, el feto hace un esfuerzo por inspirar de forma irregular, coincidiendo con una reducción de la frecuencia cardíaca y el descenso de la presión sanguínea (Provis y Moynihan, 1999).

El feto y el recién nacido son particularmente vulnerables a la asfixia durante el trabajo de parto e inmediatamente después del nacimiento. Existen cuatro mecanismos básicos para la producción de asfixia durante esos momentos (Flores, 1996): a) asfixia fetal por interrupción del flujo sanguíneo umbilical, como sucede en la compresión del cordón umbilical durante el trabajo de parto (Mota *et al.*, 2002b); b) asfixia fetal por alteración del intercambio de oxígeno a través de la placenta, como ocurre en el desprendimiento placentario; c) asfixia fetal por inadecuada perfusión de la placenta, por ejemplo en la hipotensión materna, y d) asfixia neonatal por fracaso en la expansión pulmonar al nacer o un incremento del flujo pulmonar, o por ambos.

La medición del pH, glucosa y temperatura en el recién nacido, ayudarán en la interpretación del grado de asfixia. El 90% de los recién nacidos vivos que nacen con cordón umbilical roto, teñidos de meconio en piel, débiles, con un pH umbilical menor a 7, glucosa menor a 45 mg/dL y temperatura menor a 36.5 °C, mueren en las primeras 24 horas post-parto (Provis y Moynihan, 1999).

La asfixia perinatal en bebés se caracteriza por alteraciones bioquímicas, como: hipoxemia [presión arterial de oxígeno (pO_2) menor de 50 mm Hg], hipercapnia (pCO_2 mayor de 50 mm Hg), pH menor o igual a 7.10, y HCO_3 menor o igual a 8 mEq/L (Quisber, 1995). En la asfixia fetal, los cambios predominantes son la hipoxemia y la acidosis metabólica secundaria, persistiendo un intercambio placentario insuficiente para proveer un intercambio adecuado de O_2 y CO_2 (Mota-Rojas *et al.*, 2006; Orozco-Gregorio *et al.*, 2006a).

1.2. Fisiopatología de la asfixia fetal y neonatal

Los mamíferos neonatos incluyendo el hombre, presentan similitudes respecto a las peculiaridades fisiológicas durante la asfixia (Singer, 1999). Los eventos que acontecen en un proceso de asfixia aguda tales como acidosis metabólica e hipoxia, interactúan con el bienestar del neonato y su desempeño postnatal (Mota *et al.*, 2005b). La asfixia afecta a todos los órganos y sistemas en diverso grados según la intensidad y duración. En el sistema nervioso central se produce la lesión más relevante, por sus consecuencias en cuanto a mortalidad y secuelas post-nacimiento.

Aunque el cobayo neonato es considerado maduro al nacimiento, parece ser más sensible a la hipoxia que los neonatos de otras especies (ratas, cachorros, gatitos y gazapos), que se consideran inmaduros (Stanton y Carroll, 1974). Algunos fetos presentan una tolerancia muy baja a la anoxia por asfixia y daño cerebral irreversible, que ocurre durante los primeros 5 min después de la ruptura del cordón umbilical en el lechón lo que impide el flujo sanguíneo e interrumpe la comunicación con su madre (Curtis, 1974). Cuando ocurre compresión del cordón umbilical por más de 5 min o ruptura del cordón umbilical, tal como sucede con la administración excesiva de oxitócicos, se ocasiona asfixia y daño cerebral irreversible en el feto (Curtis, 1974; Sprecher *et al.*, 1974).

La asfixia puede ser causada por el efecto acumulado de las contracciones uterinas sucesivas (Mota *et al.*, 2005c), reduciendo el oxígeno disponible en el (los) feto(s) que aún no ha nacido e incrementando así el riesgo de oclusión, daño y ruptura del cordón umbilical, e incluso desprendimiento de la placenta durante el proceso del parto previo a la expulsión del feto (English y Wilkinson, 1982). Las contracciones uterinas disminuyen el flujo sanguíneo del útero y a su vez, el intercambio gaseoso a través de la placenta (Tucker y Haut, 1990). Un mayor número de muertos al parto ocurren por la carencia de oxígeno debido a que el cordón umbilical está enrollado o roto y se impide la circulación materno-fetal (Randall, 1972; Provis y Moynihan, 1999). Por lo tanto, una tensión elevada del cordón umbilical durante el parto puede repercutir de forma negativa en el producto al incrementar el riesgo de anoxia intra-parto y aumentar la tasa de mortalidad prenatal (Gilbert, 1999; Mota *et al.*, 2005a). Sin embargo, Herpin *et al.* (1996) establecieron que la asfixia intermitente o prolongada *in utero* durante el proceso de parto no necesariamente conlleva a la muerte.

La disminución en el intercambio gaseoso materno-fetal secundario a asfixia perinatal puede ser ocasionada por distintas causas que acontecen durante el embarazo, trabajo de parto o nacimiento. Por ejemplo: interrupción de la circulación umbilical, alteración del intercambio de sangre placentaria, inadecuada perfusión del lado materno de la placenta, alteración de la oxigenación materna, e incapacidad del neonato para ejercer una adecuada insuflación del pulmón y una adecuada transición

de la circulación fetal a la neonatal (Mota-Rojas *et al.*, 2006). No obstante, la compresión del cordón umbilical y la prevención del trabajo de parto prematuro continúan siendo las principales metas de la investigación en el área de obstetricia. De igual forma, es necesario mencionar que una de las mayores causas de muerte perinatal es la prematuridad (Norman *et al.*, 1999).

1.2.1. Secuelas de la asfixia. El proceso de asfixia por el que cursa el feto pone en juego su vida; sin embargo, si logra sobrevivir a este episodio, en la mayoría de los casos tendrá secuelas graves que afectarán su viabilidad postnatal (Bracci *et al.*, 2001). La hipoxia intermitente o prolongada *in utero* y durante el parto, debilita a los fetos y disminuye su capacidad de adaptación a la vida extra-uterina. Cabe resaltar que los recién nacidos pueden diferir enormemente respecto a su vigor aparente (Mota-Rojas *et al.*, 2006). La cascada de eventos que causan daños reversibles o irreversibles a consecuencia de la asfixia se evalúan en la Figura 1 y 2.

1.2.2. Cambios circulatorios. En las primeras etapas de la asfixia, el volumen cardíaco se mantiene pero su distribución se modifica en forma radical. Se produce una vasoconstricción regional selectiva que reduce el flujo sanguíneo hacia los órganos y tejidos menos importantes como el intestino, riñón, músculos y piel (Jasso, 2002). En tanto que la vasoconstricción persista, habrá palidez cutánea intensa y cuando comienza a ceder, la piel adquiere coloración rosada, la perfusión mejora y se observa un llenado capilar adecuado (Flores, 1996). El flujo sanguíneo de órganos vitales como cerebro, miocardio y glándulas suprarrenales, se mantiene e incluso puede aumentar a causa de una vasodilatación y un consecuente incremento en la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos (Jasso, 2002). Debido a la subsiguiente irrigación y falta de oxígeno en las mucosas, clínicamente el neonato adquirirá sucesivamente los colores “azul manchado” y blanco en la piel, por la presencia de vasoconstricción periférica. El otro aspecto clínico relevante respecto a los cambios circulatorios que señala Jasso (2002), y que también ha sido reportado por Mota y Ramírez (1997ab), se refiere a la presencia de abundante edema ácido en

el saco pericárdico y cavidades torácica y abdominal (hidropericardio, hidrotórax y ascitis) en el 100% de neonatos nacidos muertos por asfixia durante el parto.

La redistribución del flujo sanguíneo ayuda a mantener un aporte adecuado de oxígeno a los órganos vitales, aunque el contenido de oxígeno en la sangre arterial esté disminuido (Flores, 1996; Orozco-Gregorio *et al.*, 2006a); sin embargo, esta redistribución de sangre produce isquemia relativa en algunos órganos y puede ser en parte, responsable de la asociación de asfixia y alteraciones como la enterocolitis necrotizante, insuficiencia renal (Phibbs, 1994) con disfunción mitocondrial, y activación de la fagocitosis a nivel cerebral (Bracci *et al.*, 2001). Alward *et al.* (1978), al inducir experimentalmente un proceso de asfixia, hipercapnia y acidosis en neonatos encontraron una disminución del flujo sanguíneo renal, debido posiblemente a un incremento en la resistencia renal originada por cambios en el tono de las arteriolas glomerulares aferente y eferente.

El flujo sanguíneo pulmonar disminuido en el neonato produce hipertensión pulmonar y cortocircuito de la sangre de derecha a izquierda. Cuando la asfixia es grave, el miocardio depende de sus depósitos de glucógeno para la obtención de energía. Si esta reserva se consume, el miocardio está simultáneamente expuesto a concentraciones de pO₂ y niveles de pH progresivamente más bajos, cuyo efecto combinado lleva a una disminución de la función miocárdica con una reducción del flujo sanguíneo hacia los órganos vitales. Esta secuencia de fenómenos cardiovasculares se manifiesta por cambios en la frecuencia cardiaca y en las presiones aórtica y venosa central (Orozco-Gregorio *et al.*, 2006a). En las primeras etapas de asfixia, la presión venosa central (aurícula derecha) puede subir levemente debido a la hipertensión pulmonar y a la vasoconstricción sistémica, que también se produce en la asfixia (Orozco *et al.*, 2007). Cuando el miocardio finalmente falla, la presión venosa central se incrementa aún más, mientras que la aórtica se reduce y se acentúa la disminución de la frecuencia cardiaca; sin embargo, la insuficiencia miocárdica no se produce hasta que el pH y la presión arterial de oxígeno se encuentran extremadamente reducidos, en el espectro de 6.90 y 20 mm Hg, respectivamente (Orozco-Gregorio *et al.*, 2006a).

1.2.3. Liberación de catecolaminas y metabolismo energético. El nacimiento ha mostrado ser un estimulante efectivo de la liberación de catecolaminas, particularmente cuando se presenta un parto complicado asociado a un proceso de hipoxia severa (Greenough *et al.*, 1987). La liberación de catecolaminas junto con otras respuestas endocrinas tales como un incremento en la concentración de hormona adenocorticotrópica (ACTH), beta-endorfinas, vasopresina y glucocorticoides, contribuyen en conjunto a la redistribución del flujo sanguíneo a órganos vitales (Challis *et al.*, 1989; Provis y Moynihan, 1999).

Respecto a las catecolaminas, Greenough *et al.* (1987), observaron en bebés, una estrecha correlación entre altos niveles de adrenalina y noradrenalina y un pH menor a 7.25. Por otro lado, Herpin *et al.* (1996), reportaron concentraciones elevadas de adrenalina y noradrenalina de 12.8 y 68.0 ng/mL, respectivamente, en neonatos que cursaron por un proceso de asfixia. Dichos investigadores consideran que los niveles hormonales se encuentran elevados debido a que juegan un papel crucial en la protección del feto durante la privación de oxígeno. Posiblemente, su aseveración está fundamentada en el hecho de que la adrenalina además de ser la encargada de estimular la glucogenólisis hepática, mediante la inhibición de la secreción de insulina y la estimulación de la secreción de glucagón, incrementa los niveles plasmáticos de glucosa (Randall, 1979; Mathews *et al.*, 2002; Orozco-Gregorio, *et al.*, 2006b). También es conocido su efecto sobre el aumento de la profundidad y la frecuencia de los latidos cardiacos (Mathews *et al.*, 2002), por tanto la función de las catecolaminas es ayudar a liberar glucosa y movilizar los nutrientes por tiempos indefinidos a tejidos vitales como el miocardio, adrenales y sistema nervioso central. Esto es posible gracias a la baja tasa metabólica de los tejidos que cuentan con gran disponibilidad o reserva fetal de sustrato de glucógeno (Cruz, 1994). Esto es de fundamental importancia ya que cuando existe un proceso de asfixia, los requerimientos energéticos de las células son cubiertos por medio de un aumento del consumo de hidratos de carbono (Vispo *et al.*, 2002). Randall (1979), encontró niveles menores en las concentraciones de glucógeno hepático y cardiaco en fetos porcinos asfixiados, en comparación con los

fetos de la misma camada que no cursaron por un proceso de asfixia; sin embargo, el glucógeno muscular fue similar en ambos grupos.

1.3. Acidosis metabólica

La acidosis metabólica es consecuencia directa de la asfixia, fundamentalmente por la producción de lactato. Trabajos recientes resaltan la importancia del valor de la lactoacidemia en el recién nacido con hipoxia (Deshpande y Platt, 1997; da Silva *et al.*, 2000). La velocidad y el grado con los que evoluciona la hipoxia son muy variables. La asfixia súbita y severa puede ser letal en menos de 10 min, mientras que la hipoxia leve puede empeorar progresivamente en media hora o más. En etapas tempranas, la hipoxia puede invertirse espontáneamente si se suprime su causa (Phibbs, 1994); sin embargo, si la hipoxia continua, el feto pasa de la oxidación aeróbica de la glucosa a la glucólisis anaerobia (Flores, 1996), a través del uso de sus reservas de carbohidratos (Curtis, 1974). Esta forma de obtención de energía por vía anaerobia le permite al feto resistir la hipoxia por más tiempo (Cruz, 1994), ya que el catabolismo de la glucosa a piruvato o lactato no requiere de oxígeno, aunque en este caso sólo se generan dos moles de ATP, mientras que en presencia de oxígeno el piruvato entra en el ciclo de Krebs, con lo que se ceden 38 moléculas de ATP a partir de ADP por cada molécula de glucosa oxidada a CO₂ y H₂O que se procesa por completo a través de la glucólisis y del ciclo de Krebs. De esta forma la glucólisis acoplada con la degradación de las reservas energéticas de los hidratos de carbono constituye una forma rápida, aunque poco eficaz, de movilizar la energía (Mathews *et al.*, 2002). Esto debido a que la acumulación de cualquiera de los dos productos finales de las reacciones glucolíticas, el ácido pirúvico y los átomos de hidrógeno combinados con el NAD⁺ para formar NADH y H⁺, detiene el proceso glucolítico y evita la formación posterior de ATP (Guyton y Hall, 1997) lo que resulta insuficiente para resistir por más tiempo la asfixia.

Cuando una persona comienza a respirar oxígeno de nuevo tras un período de metabolismo anaerobio, el ácido láctico se convierte rápidamente en ácido pirúvico y NADH más H⁺, de los que grandes porciones son oxidados inmediatamente para formar grandes cantidades de ATP. Este exceso de ATP ocasiona que hasta las tres cuartas

partes del ácido pirúvico excedente se conviertan nuevamente en glucosa (Guyton y Hall, 1997). Al respecto, algo similar pudiera haber ocurrido en neonatos porcinos cuando experimentalmente se les administraron cantidades extra de oxígeno mediante inhalación. En el estudio de Herpin *et al.* (2001), se observó un incremento en el pH sanguíneo (7.40) en lechones a los que les fue administrado oxígeno inhalado inmediatamente después del nacimiento, comparados con el grupo control (pH 7.35). Resultados similares se observaron en las concentraciones de lactato, en las que el grupo tratado con oxígeno mostró concentraciones considerablemente inferiores respecto al grupo control (34.1 vs 58.2 mg/dL). Este equipo de investigadores asume que los resultados se deben a la estimulación del metabolismo oxidativo y la completa oxidación aeróbica de la glucosa a través de la inhalación de oxígeno por el lechón, lo que resulta en una producción extra de ATP. Sin embargo, Zaleski y Hacker (1993), no encontraron una disminución en el número de mortinatos por la administración inhalada de oxígeno, aún cuando el nivel de pO_2 se incrementó. Se deduce que la suma de todos estos factores y aunado a la reducción de la ventilación pulmonar, hay un aumento de la pCO_2 del líquido extracelular. Ello da lugar a un aumento en la concentración de ácido carbónico (H_2CO_3) y de iones de hidrógeno con la consiguiente acidosis respiratoria. Aunado a esto, las reacciones metabólicas anaerobias dan lugar a alteraciones en la relación lactato-piruvato, ya que la mayor parte de piruvato se convierte en lactato con el resultado de una mayor producción de éste, lo que incrementa la formación de cantidades excesivas de ácidos orgánicos, dando como resultado un proceso de acidosis metabólica y un descenso de pH (Guyton y Hall, 1997; Vispo *et al.*, 2002). Esto origina una disminución de la función miocárdica con una reducción del flujo sanguíneo a parénquimas no vitales, mientras que el flujo sanguíneo a órganos vitales como cerebro y miocardio se mantiene temporalmente (Phibbs, 1994; Jasso, 2002).

En condiciones normales, la caída del pH que acompaña a la acidosis metabólica representa un estímulo para la ventilación. El aumento de la ventilación alveolar elimina el CO_2 , lo que reduce la pCO_2 restaurando la proporción de concentraciones de $HCO_3^-/0.03 pCO_2$ y llevando el pH hacia la normalidad (Cunningham, 1997). Sin

embargo, en casos donde se presenta una falta en la concentración de O₂, la caída del pH interfiere con el funcionamiento de enzimas metabólicas (Vispo *et al.*, 2002), debido a que la respuesta de dichas enzimas a los cambios de pH fuera del margen fisiológico, son de importancia considerable para su eficacia catalítica. La aceleración de la reacción depende en muchos casos del estado de ionización de algunos grupos, de modo que estos catalizadores sólo son eficaces dentro de márgenes determinados de pH (Mathews *et al.*, 2002).

Si la hipoxia se prolonga todavía más, el feto puede sufrir isquemia grave en los tejidos cuyo riego sanguíneo proviene de las arterias coronarias, principalmente izquierda y circunfleja, lo que origina elevación inicial de enzimas citoplásmicas y muerte celular con necrosis localizada por infarto. A toda esta serie de eventos se le conoce como cardiomiopatía hipóxico-isquémica (Jasso, 2002).

A pesar de los estudios realizados en neonatología humana, aún existe controversia respecto a la acidosis respiratoria en la muerte por asfixia. La valoración de la escala de Apgar permite una rápida evaluación del estado cardio-respiratorio y neurológico del recién nacido, cuando esta es aplicada en el periodo neonatal inmediato (primer y quinto minuto de recién nacido), y toma en cuenta cinco indicadores (Pineda y Rodríguez, 2002): frecuencia cardíaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, irritabilidad refleja y el color de la piel. Cada indicador tiene un valor mínimo de 0 y un máximo de 2 puntos. En neonatos que cursaron por un problema de distrés fetal a través de bajos puntajes en la calificación de Apgar, sólo el 31% tuvieron un pH ácido (menor a 7.1) de la sangre del cordón umbilical, cuando lo esperado era que todos los bebés cursaran por un proceso de acidosis tanto respiratoria como metabólica (Josten *et al.*, 1987). En obstetricia humana se ha propuesto el uso de nuevos indicadores para el bebé recién nacido inmediatamente después del parto, en combinación con otros indicadores anteriormente ya utilizados como lo es la escala de Apgar (Mota-Rojas *et al.*, 2006).

Randall (1971), reportó que lechones que presentaron acidemia e hipercapnia al nacimiento con niveles de pH de 6.5 y 6.95, y de 105 y 185 mm Hg de pCO₂, mostraron una baja viabilidad al nacimiento en comparación con los lechones que

presentaron niveles de pH de 7.10 a 7.42 y pCO₂ de 46 a 75 mm Hg; estos resultados los atribuyó a un proceso de asfixia fetal durante el parto. Si consideramos los valores utilizados para caracterizar la asfixia postnatal en bebés, estos valores indicarían que los lechones se encontraban en el momento del inicio de los procesos glucolíticos anaerobios y estarían cursando por un proceso patológico de acidosis severa (Saling y Langner, 1991).

Actualmente se considera que la acidosis reflejada sólo a través del pH de la sangre del cordón umbilical no es un predictor exacto de la asfixia neonatal, y no siempre está relacionada con pérdida de la viabilidad neonatal, ya que la acidosis fetal depende de factores adicionales como la duración de la misma, la tolerancia a niveles elevados de CO₂ fetal, el peso del feto, su adaptación cardiovascular, edad, tipo de parto y complicaciones neonatales, entre otros (Trujillo-Ortega *et al.*, 2006). Así mismo, se ha demostrado que las anomalías en la frecuencia cardiaca fetal producen alteraciones del equilibrio ácido básico, y la acidosis en el recién nacido se vincula con un mayor riesgo de complicaciones neonatales, de ahí la importancia de conocer las variaciones de la FCF (Mota-Rojas *et al.*, 2006) (Figura 1).

En bebés, se ha reportado supervivencia sin complicaciones a pesar de tener un pH arterial de 6.6 después de una hora del nacimiento. En términos prácticos, esto significa que la línea que divide al pH normal y anormal no es precisa y la interpretación del pH deberá tomarse siempre junto con otras medidas clínicas relevantes (Steer *et al.*, 1989). La calificación de vitalidad neonatal mide una serie de respuestas neuromusculares que pueden verse deprimidas por asfixia, pero hay que considerar que también pueden deprimirse simplemente porque el neonato no es maduro o lo suficientemente fuerte para mostrar las respuestas requeridas (Goldenberg *et al.*, 1984).

Un valor de pH bajo puede ser el resultado de periodos prolongados de hipoxia con acumulación de diferentes ácidos, pero también de un periodo corto de compresión del cordón con acumulación de bióxido de carbono en la segunda etapa del parto que no compromete la viabilidad del feto, por lo que valores bajos de pH no son sinónimos de asfixia (Goldenberg *et al.*, 1984). Piquard *et al.* (1991; citados por da Silva *et al.*,

2000), mencionan que las mediciones de acidosis metabólica pueden carecer de especificidad cuando la acidosis fetal proviene de una acidosis materna, y cuando el ácido láctico es producido por otros mecanismos encontrados durante la asfixia, tales como degradación proteica, inhibición metabólica por endotoxinas y choque séptico. Dichos autores estiman que sólo el 6% de los procesos de acidosis fetal son debidos a acidosis materna.

1.3.1. Daño cerebral. La transformación del NAD a NADH segundos después de la inducción de la asfixia, origina un aumento en la permeabilidad iónica de las membranas neuronales. Así, se origina una despolarización de las neuronas y una pérdida de la actividad eléctrica espontánea. Durante los primeros tres minutos y tras la inducción de la asfixia, se produce un rápido aumento del lactato cerebral; al mismo tiempo, disminuye la producción de ácido tricarbóxico, disminuyendo la producción de fosfatos de alta energía. De esta forma se origina una disminución rápida de la fosfocreatina y una reducción de la concentración cerebral de ATP; mientras que la glucosa y el glucógeno cerebral disminuyen de manera rápida (Menkes, 1984).

El sistema nervioso central puede utilizar además de hidratos de carbono, cetoácidos y otros ácidos grasos como generadores de energía (Cruz, 1994), cuando el cerebro del feto o del neonato es expuesto a episodios severos de hipoxia e isquemia, se da inicio a una disminución de compuestos de fosfatos de alta energía y durante los primeros minutos se inicia una serie compleja de reacciones citotóxicas dentro de las neuronas hasta terminar en muerte celular. La elevación de calcio citoplásmico, la liberación de radicales libres y mediadores pre-inflamatorios asociados a daño mitocondrial están implicados en esta fase (Wyatt, 2002). De éstos, la liberación de radicales libres desempeña un papel importante en el desarrollo del daño cerebral seguido de un proceso de encefalopatía hipóxico-isquémica (Bracci *et al.*, 2001).

En estudios realizados con fetos y neonatos, se ha demostrado que la hipoxia ocasiona un incremento en la generación de radicales libres en la corteza cerebral, que resulta en daño a la membrana celular cerebral por el incremento de la peroxidación de los lípidos de la membrana y disminución de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Así

mismo, el incremento de Ca^{++} intracelular tal vez puede activar varias vías enzimáticas tales como la fosfolipasa A_2 y el metabolismo del ácido araquidónico, las cuales generan liberación de radicales libres y peroxidación así como disfunción en el cerebro hipóxico. La presencia de defensas antioxidantes desempeña también un papel importante en la integridad cerebral fetal y neonatal durante la hipoxia (Prakash y Delivoria, 1999). Con relación a estos acontecimientos, los agentes hematopoyéticos neuroprotectores tales como la eritropoyetina (EPO), pueden ejercer un efecto protector sobre las neuronas y prevenir su muerte celular. De acuerdo con Aydin *et al.* (2003), la administración de una inyección intracerebro-ventricular de EPO inmediatamente después del inicio de la hipoxia isquémica en neonatos de rata, disminuyó el daño cerebral hipóxico-isquémico.

Las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral inducidas por la asfixia son igualmente importantes para la comprensión de la génesis de los daños al nacimiento, ya que inicialmente hay una redistribución del gasto cardíaco en el que una gran proporción se destina al cerebro, con un incremento del flujo cerebral sanguíneo del 30 al 175% del. Al mismo tiempo, se presenta una pérdida de la autorregulación vascular cerebral. A consecuencia de esto, las arteriolas cerebrales no son capaces de responder a los cambios en la presión de perfusión y a las concentraciones de anhídrido carbónico, originando un flujo cerebral pasivo dependiente de la presión. Una vez que la autorregulación cerebral no es funcional, el sistema arteriolar es incapaz de responder al déficit de presión de perfusión por medio de la vasodilatación, originando una disminución drástica del flujo cerebral sanguíneo (Menkes, 1984).

da Silva *et al.* (2000), señalan que recientemente la relación entre asfixia intra-parto y las anormalidades neurológicas han sido cuestionadas, y citan varios estudios en los cuales se ha observado una mínima relación entre acidosis metabólica y las consecuencias neurológicas neonatales. Por ejemplo, Adamson *et al.* (1995), a través de un estudio epidemiológico observaron que la mayoría de los problemas neurológicos neonatales fueron correlacionados con piroxia materna durante el parto y con tratamientos con tiroxina y ruptura temprana de las membranas.

2. El cobayo (*Cavia porcellus*) como modelo experimental de desarrollo uterino, crecimiento fetal, asfixia perinatal y dilatación vascular pulmonar.

La asfixia perinatal es, y continuará siendo, una de las principales preocupaciones en salud mundial debido a las complicaciones y graves secuelas que se presentan si el neonato sobrevive al evento de asfixia (Hernández-González *et al.*, 2006). En medicina veterinaria, el proceso de asfixia perinatal ha sido objeto de diversas investigaciones en las que el modelo experimental por excelencia ha sido el feto de especies animales mamíferas debido a que los mamíferos al nacimiento incluyendo al hombre, presentan similitudes en los mecanismos fisiológicos mostrados durante la asfixia (Singer, 1999). La asfixia perinatal inducida *in utero* o durante el parto en animales de laboratorio es producida por la compresión del cordón umbilical (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2006). Los modelos animales experimentales usados extensamente en este tipo de investigaciones biomédicas son el cobayo (*Cavia porcellus*) y la rata (*Rattus norvegicus*) de laboratorio. Los datos disponibles acerca de la reproducción del cobayo y la rata, son indispensables para poder llevar a cabo investigación y/o reproducción de estas especies. La respuesta cardiovascular del feto que cursa por un proceso de hipoxemia está bien caracterizada en bebés humanos, en los que existe una redistribución del flujo sanguíneo a órganos útiles como corazón, cerebro y glándulas adrenales (Hernández-González *et al.*, 2006). No obstante, existen diferencias en los mecanismos patológicos y neuropatológicos entre cobayos y ratas que se pueden explicar por la susceptibilidad individual de las especies a la hipoxia-isquémica, la cual dependerá de su metabolismo, consumo de oxígeno y diferentes mecanismos que incluyen a los factores inductores de hipoxia. También debemos ser prudentes al llevar a cabo la comparación entre humanos, cobayos y ratas, en términos de metabolismo y susceptibilidad a hipoxia.

2.1. El cobayo en la investigación científica de asfixia perinatal inducida

Durante la gestación puede haber algunas condiciones intrauterinas adversas que varían en cuanto a la duración, severidad y recuperación (Hernández-González *et al.*, 2006). No obstante, hay estudios previos en los que se demuestra la capacidad de recuperación del feto respecto a las condiciones intrauterinas adversas cuando los periodos de exposición son cortos (Gardner *et al.*, 2001). La asfixia perinatal es, y continuará siendo, una de las principales preocupaciones en salud mundial debido a las complicaciones y graves secuelas que se presentan si el neonato sobrevive al evento de asfixia (Hernández-González *et al.*, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo, entre 4 y 9 millones de recién nacidos presentan asfixia cada año. De estos aproximadamente 1.2 millones muere y casi el mismo número presentará secuelas graves (OMS, 1998), la OMS también estima que el 29% de mortalidad en el mundo es secundario a asfixia al nacimiento. El proceso de asfixia perinatal ha sido objeto de diversas investigaciones en las que el modelo experimental por excelencia ha sido el feto de especies animales mamíferas debido a que los mamíferos al nacimiento incluyendo al hombre presentan similitudes en los mecanismos fisiológicos mostrados durante la asfixia (Arbay *et al.*, 1996). Una diversidad de técnicas experimentales han sido usadas para producir largos periodos de asfixia *in utero*, los métodos más comunes son aquellos que restringen la capacidad de la placenta para transportar nutrientes y oxígeno al feto (Hernández-González *et al.*, 2006). La asfixia perinatal inducida *in utero* o durante el parto en animales de laboratorio es producida por la compresión del cordón umbilical, como resultado de ésta ocurren cambios en la circulación pulmonar causando un incremento en la resistencia vascular pulmonar, alteración pulmonar en la reactividad vascular, e inducción vascular y remodelación cardiaca, estos cambios pueden ser prevenidos por inhibición selectiva de fosfodiesterasa (PDE) tipo 5 (Larrue *et al.*, 2005).

El cobayo de laboratorio (*Cavia porcellus*), también denominado cuyo, cuye, curiel, conejillo de indias, cobaio en portugués y en inglés guinea pig o cavi, es un mamífero pequeño que pertenece al orden *Rodentia*. Este animal es originario de Sudamérica, es de fácil manejo y se le utiliza comúnmente en investigaciones biomédicas, como

pruebas farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas (Noonan, 1994). Como animal de laboratorio, la estirpe Dunkin-Hartley es la más difundida y de mayor distribución en el mundo (Sutherland y Festing, 1987). El cobayo es una especie precoz, que nace con los ojos abiertos, y un elevado grado de coordinación neuro-muscular y competencia neuro-conductual, capaz de termo-regularse y alimentarse de manera independiente desde el primer día de vida (Vaillancourt y Boksa, 2000).

Al comparar el cobayo con ratones, ratas y hámsteres, se deduce que es menos probable que el cobayo sea afectado por deficiencias en el cuidado materno, ya que el resto de las especies antes mencionadas son animales menos maduros al nacimiento debido a que nacen ciegos, con los conductos auditivos cerrados, sin pelo, incapaces de regular su temperatura, y dependen completamente de los cuidados y atención de su madre para sobrevivir (Vaillancourt y Boksa, 2000; Villanueva y Hernández, 2004) como lo sería también en el ser humano (Bernert *et al.*, 2003). A diferencia de la rata, el cobayo alcanza competencia neuro-conductual temprana y su cerebro está completamente desarrollado al nacimiento (Vaillancourt y Boksa, 2000). Por ejemplo, las enzimas glucolíticas del cerebro de cobayo recién nacido están a los mismos niveles de un adulto, en contraste, los niveles enzimáticos en el cerebro de la rata al nacimiento son bajos respecto a un adulto de la misma especie.

Existe abundante literatura dispersa en un sin número de investigaciones acerca de los aspectos reproductivos del cobayo y la rata, esta información es indispensable para llevar a cabo investigación y/o reproducción de estas especies, por tal motivo, la información básica concerniente a la reproducción del cobayo y rata han sido compiladas y resumidas (Hernández-González *et al.*, 2006) en el Cuadro 1. Cabe señalar, que el cobayo y la rata son importantes modelos animales de experimentación debido a las similitudes que existen con la biología reproductiva del ser humano.

Cuadro 1. Indicadores reproductivos del cobayo y la rata.

Parámetros	Cobayo (Hartley)	Rata (Wistar)
Peso adulto:		
Macho (g)	900-1200	300-400
Hembra(g)	700-900	250-300
Peso al nacimiento (g)	70-100	5-6
Temperatura corporal (°C)	37.2-39.5	37.5
Tiempo de vida (años)	4-5	2.5-3
Consumo alimento (100 g de peso corporal/día)	6 g	5 g
Consumo agua (100 g de peso corporal/día)	10-40 ml	8-11 ml
Inicio de madurez sexual:		
Macho		
Peso (g)	600-700	200-250
Edad (d)	90-120	50±10
Hembra		
Peso (g)	350-450	150-180
Edad (d)	60-90	50±10
Ciclo estral (días)	14-17	4-5
Gestación (días)	59-72	21-23
Pseudo preñez (días)	17	12
Fertilidad de estro post-parto (%)	60-80	50
Tamaño camada	2-5	8-12
Peso al destete (g)	150-200	35-55
Frecuencia respiratoria (respiraciones/min)	42-104	85
Frecuencia cardiaca (respiraciones/min)	230-380	300-500
Duración del estro (horas)	6-11	10-20
Esquema de monta	Pares 1M/10H	o Pares o 1M/10H
% Mortalidad		
Nacimiento	4.83%	
Destete	15.93%	

Fuente: Hernández-González et al., 2006. pág 378.

2.1.1. Asfixia perinatal natural e inducida; efectos adversos a nivel de SNC. El parto normal está asociado a un incremento en la liberación de hormonas en plasma incluyendo a las catecolaminas y glucocorticoides entre otras, las cuales sirven para proteger al neonato de hipoxia y promover la adaptación de la vida extrauterina a través del pulmón y de otras funciones (Lagercrantz, 1994). Los humanos, cobayos y ratas que nacen por cesárea carecen del incremento de catecolaminas y presentan bajos niveles de glucocorticoides en el periodo neonatal, contrario a lo que ocurre en nacimientos espontáneos (El-Khodor y Boksa, 1998). Estas deficiencias hormonales pueden tener efectos directos sobre el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Vaillancourt y Boksa, 2000). Un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que las complicaciones perinatales, a menudo involucran hipoxia fetal o neonatal, y están asociados con un incremento en el riesgo para desarrollar esquizofrenia (Zornberg *et al.*, 2000), sobre todo en aquellos que nacieron con bajo peso al nacimiento o prematuros (Mallard *et al.*, 2000). Un periodo de hipoxia global al nacimiento sirve como un estímulo potente para reactivar las catecolaminas en el plasma de ratas y humanos, así como la activación a nivel central de la respuesta de ventilación compensatoria (Lagercrantz, 1994; El-Khodor y Boksa, 1998). La respuesta cardiovascular del feto que cursa por un proceso de hipoxemia está bien caracterizada en bebés humanos, en los que existe una redistribución del flujo sanguíneo a órganos útiles como corazón, cerebro y glándulas adrenales (Jensen *et al.*, 1999; Richardson y Bocking, 1998). No obstante, la respuesta fetal es distinta dependiendo de la duración y severidad de hipoxemia. Durante la hipoxemia aguda, hay un incremento en la presión arterial sanguínea con decremento del latido cardiaco (Jensen *et al.*, 1999) e incremento de los niveles de norepinefrina y epinefrina en plasma (Richardson y Bocking, 1998).

Se ha demostrado que el cobayo adulto de la estirpe Hartley-Duncan con una gestación de 58 a 62 días sometido a estrés o hipoxia crónica, exhibe cambios morfológicos y hematológicos e incrementa la producción de óxido nítrico y contribuye al efecto vasodilatador de la acetilcolina (Thompson *et al.*, 2000). Otros estudios previos realizados en la misma especie animal han demostrado que la acetilcolina

estimula la liberación de un factor de hiperpolarización derivado de endotelio y que el óxido nítrico puede activar canales de potasio K_1 (Waldron y Cole, 1994). La hipoxia crónica incrementa la contribución del óxido nítrico a la acetilcolina induciendo vasodilatación en el corazón fetal de cobayo. La activación de canales K_1 también contribuyen a la dilatación del corazón si todavía no está afectado por la hipoxia crónica. El incremento de sintetas de óxido nítrico endotelial y la expresión de ARNm en el corazón fetal por hipoxia crónica, sugieren que la producción de óxido nítrico por el corazón puede ser sobre-regulada bajo estas condiciones como una respuesta adaptativa al estrés hipóxico (Thompson *et al.*, 2000). Por otra parte, el cambio en el peso del corazón de fetos de cobayo sometidos a hipoxia es relativamente modesto en comparación a otras especies. Sin embargo, en otras especies animales la exposición a hipoxia crónica causa incremento sanguíneo debido al crecimiento de vasos sanguíneos en el corazón de modelos animales de recién nacidos (Hernández-González *et al.*, 2006).

Los modelos animales proporcionan una gran oportunidad para probar si las complicaciones al parto, como son los efectos a causa de la hipoxia sobre la actividad dopaminérgica en el SNC, pueden causar cambios a largo plazo en términos de días, semanas, meses e incluso años después del nacimiento (Vaillancourt y Boksa, 2000). El desarrollo del cerebro bajo condiciones intrauterinas sub-óptimas contribuyen a muchos desordenes neurológicos que se manifiestan después del nacimiento, la causa más importante de daño neurológico en el recién nacido es la asfisia perinatal al producir daño cerebral reversible (que puede ser de consecuencias mínimas como en el caso de la disfunción cerebral, retraso mental y epilepsia), o irreversible con daño severo como la muerte (Hill, 1991), por la alteración que produce el fenómeno hipoxia-isquemia al dañar ciertas sub-poblaciones de neuronas que van muriendo mientras que otras sobreviven (Bottiger *et al.*, 1998). La neuropatología causada por hipoxia-isquémica perinatal está atribuida a un daño en el flujo sanguíneo cerebral que probablemente ocurre a consecuencia de la interrupción en el flujo de sangre en placenta (isquemia) e intercambio gaseoso (hipoxia), que puede ser agudo o crónico (Hernández-González *et al.*, 2006) (Figura 2).

Se ha demostrado en fetos de ratas extraídos por cesárea, que se pueden producir cambios en la bioquímica dopaminérgica y de comportamiento a largo plazo. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que el cerebro de la rata es un tanto inmaduro para poder llevar a cabo una comparación con cerebros de humanos al nacimiento razón por la cual, se debe determinar si las complicaciones al nacimiento alteran las funciones mediadas por la dopamina en una especie animal que posea un SNC más maduro al nacimiento, como lo es el SNC del cobayo (Vaillancourt y Boksa, 2000). Con relación a la posible relevancia clínica, se sabe que el cerebro de rata generalmente es menos maduro al nacimiento que el cerebro del recién nacido humano, aproximadamente al día 10 post-nacimiento, el cerebro de la rata está en la etapa de crecimiento rápido, aceleración de la sinaptogénesis, mielinización y proliferación de astrocitos, características similares del humano (Romijn *et al.*, 1991) y del cobayo recién nacido a término. Recientemente, se ha propuesto que el cerebro maduro es más susceptible a daño hipóxico-isquémico cerebral (Yager y Thornhill, 1997), y que la elevada susceptibilidad del animal maduro no solo puede ser el reflejo de la función metabólica, sino también de la diferente capacidad del mecanismo inmaduro para llevar a cabo los procesos de reparación e incrementar su potencial por la proliferación de neuronas (Bernert *et al.*, 2003).

Las neuronas del hipocampo, cerebelo, cuerpo estriado, tálamo y neo-corteza se caracterizan por su vulnerabilidad al daño hipóxico-isquémico. Aparte de la muerte celular aguda causada por asfixia perinatal, es necesario conocer si ésta puede provocar efectos detrimentales sobre el SNC meses e incluso años después del nacimiento del individuo (ej. como inductor de neurodegeneración) (Blennow *et al.*, 1995). Es bien conocido que el SNC inmaduro es más resistente a hipoxia que el SNC maduro (Jilek *et al.*, 1970). Los neonatos de ratas resultan ser muy hábiles ya que pueden sobrevivir de 20 a 22 min de anoxia, mientras que los cobayos sólo son capaces de sobrevivir a 2 min de anoxia al nacimiento debido a la relativa madurez del SNC al nacimiento (Vaillancourt y Boksa, 2000). Lubec *et al.* (2000), mencionan que la asfixia perinatal en ratas causa una supervivencia de 20 minutos de hipoxia, mientras que el cobayo solo tolera 4 minutos de estado hipóxico. No obstante, al comparar el

cobayo con otras especies animales como fetos de conejo u oveja, este posee la habilidad de tolerar de mejor manera la asfixia debido a algunas diferencias relacionadas a la edad gestacional, niveles de hipoxia, duración a la exposición, e incluso mejor eficiencia en el intercambio gaseoso-placentario que aún es desconocido (Thompson *et al.*, 2000).

El desarrollo cerebral bajo condiciones intrauterinas sub-óptimas contribuye a muchos desordenes neurológicos que se manifiestan después del nacimiento (Harrison, 1999). Se ha demostrado que el régimen crónico y agudo a causa de compromiso intrauterino resulta en alteraciones de conectividad neuronal (Bisignano y Rees, 1988). Los cambios del sistema mono-aminérgico relacionados a la asfixia perinatal han sido reportados por diversos grupos, y la sensibilidad de este sistema al daño asfíctico fue acentuado en hombres y modelos animales (Blennow *et al.*, 1995).

Bernert *et al.* (2003), mencionan que la inducción de asfixia perinatal en un modelo animal como lo es el cobayo, es muy parecida a la asfixia perinatal intrauterina, por la presencia de hipoxia química y ventilación mecánica, dando inicio a la neurodegeneración como se ha observado en el sistema humano al ser evaluado por un criterio neuropatológico clásico. Dichos investigadores, caracterizaron la neurodegeneración, gliosis, pérdida neuronal y diferenciación, así como alteraciones en el sistema funcional, caracterizado por neurotransmisores específicos en un modelo animal de asfixia perinatal con animales maduros al nacimiento. La técnica de asfixia perinatal, consiste en la extirpación de los cueros uterinos que contienen los fetos para ser separados de sus membranas y secados en una campana de flujo laminar para realizar la inducción de la asfixia en baño de agua a 37 °C por diferentes periodos de tiempo (2, 3, 4 o 5 minutos) aunque la exposición a 5 minutos de asfixia no es compatible con la supervivencia del cobayo.

Se ha demostrado que ocurre neurodegeneración con muerte neuronal, proliferación glial, y cambios en la neurotransmisibilidad en varios modelos animales con asfixia perinatal como la rata (Blennow *et al.*, 1995) y el cerdo (Fritz, *et al.*, 1996). Sin embargo, la primera evidencia de neurodegeneración en diversas regiones cerebrales se dio a conocer en un modelo animal de cobayos con inducción de asfixia

perinatal, 3 meses después de haberse llevado a cabo el parto (Bernert *et al.*, 2003). No obstante, debemos estar conscientes de que aunque la neurodegeneración mostrada en el modelo animal con cobayo es inequívoca, no pueden ser extrapoladas las implicaciones directas en el neonato humano (Hernández-González *et al.*, 2006).

Al comparar los datos obtenidos en cobayo (Bernert *et al.*, 2003) con otro modelo animal de asfixia perinatal como lo es la rata inmadura respecto al mismo punto de comparación, se pueden encontrar diferencias en términos de regiones afectadas e intervención de neurotransmisores individuales (Kohlhauser *et al.*, 1999), indicando diferencias específicas. Cuando se comparan los resultados de cobayo con el sistema humano, se encuentra pérdida neuronal, gliosis, y cambios monoaminérgicos y colinérgicos en áreas afectadas de neonatos asfixiados (Barkovich, 1992). Por lo tanto, Bernert *et al.* (2003), sugieren que el uso de cobayo como modelo experimental de asfixia perinatal es muy parecido a la asfixia perinatal en humano en diversos aspectos, garantizando así los estudios acerca de asfixia perinatal. No obstante, las comparaciones hechas con fetos de cobayo sobre otras especies de animales recién nacidos deben hacerse con precaución porque aún no está claro qué constituye la diferencia entre especies.

En síntesis, las diferencias que existen en los mecanismos patológicos y neuropatológicos entre las diferentes especies de mamíferos se pueden explicar por la susceptibilidad individual de las especies a la hipoxia-isquémica, la cual dependerá de su metabolismo, consumo de oxígeno y diferentes mecanismos que incluyen a los factores inductores de hipoxia. No obstante, debemos ser prudentes al llevar a cabo la comparación entre ratas, humanos y cobayos en términos de metabolismo y susceptibilidad a hipoxia (Hernández-González *et al.*, 2006).

2.2. Restricción de crecimiento fetal intrauterino

La forma más común en la que se presentan condiciones intrauterinas adversas en gestaciones humanas es la compresión del cordón umbilical ya que ocurre con una incidencia del 40% (Clapp *et al.*, 1999). Esta es la razón por la cual se han desarrollado algunas técnicas para la inducción de condiciones adversas *in utero* en modelos

animales experimentales a fin de caracterizar la respuesta cardiovascular (bradicardia, presión arterial y vasoconstricción periférica), magnitud hemodinámica, endocrina y metabólica del feto. El método irreversible y severo más común que induce condiciones intrauterinas adversas, es la compresión temprana del cordón umbilical que causa reducción del flujo sanguíneo umbilical en un 30%, y restricción de la capacidad placentaria para transportar nutrientes y oxígeno en el feto; como resultado de esta compresión hay una reducción en el tamaño de la placenta que da inicio a hipoglucemia, hipoxemia, alteración en el balance endocrino y retraso en el crecimiento fetal, estos son indicativos de daño cerebral que a su vez, incrementan la incidencia en la mortalidad fetal (Gardner *et al.*, 2001). La restricción del crecimiento fetal, es responsable de una considerable mortalidad y morbilidad perinatal ya que incrementa el riesgo de complicaciones previas al nacimiento en los neonatos, como son diestrés, asfixia, hipotermia, encefalopatía neonatal, hipotermia e hipoglucemia, pobre alimentación así como riesgos neurológicos a largo plazo, y desordenes del desarrollo (Wareing *et al.*, 2005).

En estudios previos se ha demostrado que la restricción de crecimiento fetal espontánea en cobayo puede ocurrir con una larga duración de hipoxia y en edades gestacionales tempranas. Tolcos *et al.* (2002), desarrollaron un modelo experimental para producir restricción de crecimiento fetal *in utero*, a través de la alteración y restricción de la perfusión útero-placentaria por medio de una técnica que consiste en la ligadura unilateral de la arteria uterina materna entre el día 28 y 30 de gestación en cobayas gestantes de la cepa Monash. Esta técnica ha sido empleada por diversos investigadores obteniendo como resultado una reducción en el peso y tamaño de los fetos, hipoxia crónica, desnutrición (asociada a reducción celular) (Lafeber *et al.*, 1984), alteración en el balance endocrino (Jones *et al.*, 1987) y restricción de crecimiento asimétrico en cobayos recién nacidos. También se han observado algunas alteraciones en la estructura cerebral de neonatos nacidos con bajo peso de acuerdo a su edad gestacional, que cursaron por un proceso de restricción de crecimiento que incluyen una reducción en el peso cerebral, peso del cerebelo y volumen del hemisferio cerebral (Mallard *et al.*, 2000). En contraste, Thompson *et al.* (2000), demostraron en

cobayas que la hipoxia crónica causada por la restricción de crecimiento uterino no altera el crecimiento fetal, peso del corazón, cerebro y placenta, así como la relación del peso de estos órganos respecto al peso corporal de la cobaya. Otros estudios realizados en cobayas con restricción de crecimiento fetal intrauterino han demostrado una reducción del flujo sanguíneo (Detmer y Carter, 1991) y oxigenación (Jensen *et al.*, 1996). De acuerdo con Mallard *et al.* (2000), la restricción de crecimiento fetal intrauterino en ratas y/o cobayas resultan en cambios drásticos en cuanto al contenido de amino ácidos y metabolismo de la serotonina a nivel cerebral asociado a retraso en la maduración de la función colinérgica.

La restricción del crecimiento fetal trae como consecuencia la asfixia progresiva que es un estrés fisiológico que estimula el sistema nervioso autónomo en general, y en particular activa los receptores de dióxido de carbono y oxígeno (Ting *et al.*, 1994). Tolcos *et al.* (2002), reportaron una reducción cerebral de la tolerancia a la hipoxia en cobayos, semejante a lo que ocurre en diversas especies, demostrando que la restricción de crecimiento fetal intrauterino está asociada con alteraciones en la respuesta de ventilación y termorregulación del recién nacido sometido a asfixia e hipercapnia, ya que la ventilación basal durante un estado de hipercapnia tiende a elevarse y se incrementa significativamente durante la asfixia progresiva respecto a la concentración de CO₂ (> al 5% de CO₂).

2.3. Uso de citrato de sildenafil y su efecto sobre el sistema materno-fetal en mujeres y modelos animales

El citrato de sildenafil también conocido como sildenafilo o sildenafil, es un potente inhibidor competitivo de la PDE5, éste aumenta el efecto vasodilatador del óxido nítrico (ON) al evitar la degradación del segundo mensajero GMPc (Gobry *et al.*, 2000; Michelakis *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2004), potencializando el efecto vascular del ON en el músculo liso (Sher y Fisch, 2000; Muirhead *et al.*, 2002) iniciando la vasodilatación ya que el citrato de sildenafil actúa a través del ON-GMPc (Zoma *et al.*, 2004), al incrementar las concentraciones de GMPc (Cameron y Campbell, 1998) ejerce un efecto de relajación en el músculo liso y produce en su momento una

desfosforilación de cadenas cortas (ligas) de miosina (Norman *et al.*, 1999). La acción relajante de GMPc en músculo liso, es a través del efecto de un flujo disminuido de la enzima proteína cinasa G (PCG), lo que resulta en reducción de los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular y una disminución de la sensibilidad en los elementos contráctiles del Ca^{2+} (Khan *et al.*, 2004).

Desde la introducción del citrato de sildenafil en 1997, este ha sido usado ampliamente en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE), pero hasta entonces no se había evaluado su efecto en mujeres (Sher y Fisch, 2000). Aunque el citrato de sildenafil es una droga bien establecida para el tratamiento de DE, esta droga es efectiva cuando se aplica de forma terapéutica en mujeres post-menopausicas con disfunción sexual (Zoma *et al.*, 2004). El citrato de sildenafil a altas concentraciones activa la relajación del miometrio en mujeres embarazadas, esto incrementa la posibilidad de que el citrato de sildenafil o moléculas relacionadas puedan tener un futuro promisorio por su potente aplicación tocolítica (Khan *et al.*, 2004) debido a que se ha observado que el citrato de sildenafil potencializa el efecto de vasodilatación de los nitratos (Zoma *et al.*, 2004). La aplicación vaginal de sildenafil parece ser efectiva y seguramente producirán gran interés las observaciones sobre los efectos en el sistema materno-fetal (Khan *et al.*, 2004).

Es conocido que el ON está involucrado en una variedad de procesos fisiológicos (Norman *et al.*, 1999), actúa en el sistema nervioso central y periférico siendo un mediador importante de interacciones paracrinas, en especial en el sistema vascular. Este es un poderoso inhibidor de agregación plaquetaria y un potente vasodilatador (Cameron y Campbell, 1998). La variedad en las funciones del ON se reduce a la presencia de componentes que generan aniones de superóxido como la xantina y xantina oxidasa, y su acción se potencializa por el superóxido dismutasa (SOD) enzima distribuida a lo largo del sistema que inactiva los aniones de superóxido (Cameron y Campbell, 1998).

Enzimas generadas a partir del ON como lo son la sintasa del óxido nítrico (SON) han sido descritas en el endometrio de un cierto número de especies, sugiriendo que el ON puede estar involucrado en algunas funciones endometriales como lo es el control

local del endometrio (Cameron y Campbell, 1998). Isoformas del ON, iSON (inducible) y eSON (endotelial) han sido identificadas en el endotelio vascular del endometrio y miometrio humano (Norman *et al.*, 1999; Sher y Fisch, 2000). Tres isoformas de SON; eNOS y nNOS (neuronal), ambas dependientes del calcio y de enzimas las cuales están expresadas constitutivamente han sido descritas en tejido miometrial (Norman *et al.*, 1999), su expresión en el endometrio fue descrita originalmente como enzimas constitutivas generadoras de pequeñas cantidades de ON para neurotransmitir y mantener el tono vascular (Cameron y Campbell, 1998). Mientras que la enzima iSON es independiente del calcio, cuya expresión puede ser inducida en diversas células por varias citocinasas (Norman *et al.*, 1999).

Una variedad de vías de señalamiento y moléculas que intervienen para mantener la contractilidad uterina durante la gestación y hasta su finalización han sido estudiadas, incluyendo el ON, GMPc, PCG y canales iónicos en miometrio de humanos y ratas (Khan *et al.*, 2004). Schmidt *et al.* (1992), sugieren que el ON está involucrado en la relajación miometrial como efecto del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (cgrp). El ON derivado del endometrio puede contribuir en el control local de la contractilidad miometrial. Sin embargo, el ON derivado del endometrio también puede suprimir la contractilidad miometrial. Por lo tanto, existe interés sobre la parte en que el ON puede mantener la relajación miometrial durante la gestación, sugiriendo la administración de donadores de ON como una propuesta terapéutica para el tratamiento durante el trabajo de parto (Cameron y Campbell, 1998).

Estudios recientes han examinado el endometrio en diferentes especies, rata (Schmidt *et al.*, 1992; Buhimschi *et al.*, 2004), ovino (Zoma *et al.*, 2004) e incluso humanos (Cameron y Campbell, 1998; Khan *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 1999), para discutir la potente acción vasodilatadora y antiplaquetaria del ON, ya que pueden jugar un papel importante en la implantación, o bien el ON derivado del endometrio puede actuar como un relajante en el músculo liso vascular y endometrial (Cameron y Campbell, 1998).

En ratas y conejos, se ha demostrado la importancia del ON en el mantenimiento de la relajación uterina durante el trabajo de parto; la actividad del ON en el tejido uterino

es elevada a lo largo de la gestación, pero disminuye antes del momento del parto, aunque otros han postulado que el ON también puede ser responsable del mantenimiento de la relajación uterina durante el trabajo de parto en humanos (Norman *et al.*, 1999). Dos líneas de investigación apoyan estas hipótesis, la primera que el ON relaja el miometrio humano *in vitro* y la segunda, que productos de ON-GMPc están presentes en el miometrio humano de gestantes y no gestantes. Estos datos sugieren que el ON es producido en el miometrio durante la gestación y puede mantener la relajación uterina por un efecto de relajación en el miometrio. Este señalamiento es de suma importancia ya que la relajación automática del útero grávido durante la mayor parte de la gestación facilita el crecimiento y maduración fetal (Khan *et al.*, 2004).

El cobayo y la rata también se han utilizado como modelos animales para estudiar el efecto del citrato de sildenafil sobre la repolarización cardíaca y sobre los cambios estructurales en los órganos genitales en respuesta a los casos clínicos de muerte repentina en pacientes humanos que consumieron citrato de sildenafil. Chiang *et al.* (2002), usaron técnicas convencionales de micro-electrodos en músculo aislado de cobayo, encontrando que la duración del potencial de acción con 90% de repolarización no fue afectada por el consumo de citrato de sildenafil en rangos terapéuticos ($1 \leq \text{microM}$), pero fue acortada por elevadas concentraciones ($\geq 10 \text{ microM}$). La dosis dependiente del citrato de sildenafil bloqueó los canales de Ca^{2+} tipo-L, pero no tuvo efectos sobre la persistencia de corrientes de iones de Na^{+} en los miocitos ventriculares de cobayo, concluyendo que el citrato de sildenafil no prolonga la repolarización cardíaca. Por otro lado, Kilinc *et al.* (2003), determinaron los efectos ultra-estructurales que causa la administración de 0.5 mg/kg de citrato de sildenafil en los órganos genitales de ratas Wistar que estaban ciclando, concluyendo que son evidentes los cambios histológicos causados por la administración de sildenafil en el cuerpo cavernoso del clítoris y las glándulas de Bartolini debido a que fueron los órganos que mostraron los mayores efectos.

La rata de estirpe Sprague-Dawley ha sido usada por Kim *et al.* (2004), para investigar la respuesta vaginal de la hembra y el papel del ON sobre la vía del flujo

sanguíneo vaginal *in vivo*. Los cambios del flujo sanguíneo vaginal fueron inducidos por estimulación nerviosa pélvica a través de un láser de efecto Doppler, que determina la frecuencia de respuesta en cada animal. En suma, los cambios en el flujo vaginal fueron medidos después de la administración intravenosa de un inhibidor de sintasas de óxido nítrico L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil ester) o citrato de sildenafil, inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 5. Dichos investigadores concluyeron que la administración de citrato de sildenafil incrementó significativamente la estimulación nerviosa pélvica inducida por el flujo de sangre vaginal ($166.9\% \pm 25.8\%$ vs testigo a 30 minutos, $p < 0.00001$).

Sin lugar a duda, el endometrio juega un papel importante en hembras fisiológicamente reproductivas (Norman 1996; Cameron y Campbell, 1998). No obstante, el conocimiento obtenido en los últimos años sobre el trabajo de parto fisiológico, ha avanzado considerablemente, aunque el estudio de nuevas drogas que aseguren la ausencia de efectos colaterales de agentes tocolíticos usados comúnmente para tratar el trabajo de parto han sido lentas (Khan *et al.*, 2004).

2.4. Uso de citrato de sildenafil y su efecto sobre el sistema pulmonar en humanos y animales de laboratorio.

La hipertensión pulmonar persistente del neonato (PPHN), contribuye de forma considerable al aumento de la morbilidad y mortalidad neonatal, es conocida como un síndrome clínico asociado a diversas enfermedades cardio-pulmonares, incluyendo la asfixia durante el parto, aspiración de meconio y síndrome de distrés respiratorio (Larrue *et al.*, 2005; Villanueva-García y Mota-Rojas., 2006). La PPHN está comúnmente asociada con el síndrome de aspiración de meconio (SAM), 66% de casos de PPHN son consecuencia del SAM. Existe un número de tratamientos posibles para esta condición, en la que es importante normalizar el pH, que se logra apropiadamente por administración alcalina, mejor que la hiperventilación, la cual está asociada con problemas de reducción en la perfusión cerebral e incremento de riesgo de enfermedad crónica pulmonar y neumotórax (Fernández *et al.*, 2003). El calcio

aumenta la contracción de la musculatura lisa en vasos sanguíneos, la cual depende de la disponibilidad de calcio que afectan las células.

El óxido nítrico es un vasodilatador pulmonar específico cuando es inhalado y se ha reportado que su uso es efectivo en neonatos con SAM. El descubrimiento del ON ha revolucionado el tratamiento de hipertensión pulmonar aguda, ya que produce vasodilatación pulmonar en regiones ventiladas de pulmón (Shekerdemian *et al.*, 2004). El ON actúa como un potente vasodilatador pulmonar selectivo; sin embargo, su uso es limitado debido a su vida media relativamente corta (Michelakis *et al.*, 2002) en estudios realizados *in vivo* (Cameron y Campbell, 1998). No obstante, hay pocos reportes y no hay evidencia aleatoria en las que se justifique su uso. Por tales motivos, actualmente existe una gran variedad en los tratamientos empleados en la hipertensión pulmonar severa (epoprostenol i.v., óxido nítrico i.); sin embargo, estas terapias son costosas, tienen efectos colaterales y hay ausencia en la selectividad de los responsables en la vasodilatación (Ardeschir *et al.*, 2002).

En 1999, un par de investigadores describieron tres casos en niños recién nacidos de 4 meses de edad a quienes administraron sildenafil vía oral, con el fin de aminorar los efectos de una repentina discontinuación de ON inhalado por los tres pacientes, basados en los resultados iniciales, los autores concluyen que el sildenafil fue efectivo ya que incrementó los niveles de GMPc en la circulación normal y a nivel intracelular, logrando la prevención de una degradación rápida de GMPc y repercutir en la hipertensión cuando se discontinúa la terapia del ON inhalado (Atz y Wessel, 1999). Un sinnúmero de documentos también han sido publicados describiendo la eficacia del sildenafil en adultos con hipertensión pulmonar. En el 2002, se publicó un estudio realizado en 14 pacientes de 5 a 30 años de edad que fueron tratados con sildenafil como parte de una terapia de hipertensión pulmonar crónica. Nueve pacientes padecían hipertensión pulmonar primaria, los cinco restantes tenían hipertensión pulmonar. Todos ellos recibieron una terapia estándar iniciada con sildenafil, la media de la dosis usada fue de 87.5 mg/día en niños con un peso menor de 30 Kg, y 150 mg/día en pacientes adultos, clínicamente se reportó mejora en todos los pacientes,

registrando una reducción en la presión sistólica del ventrículo derecho, sólo en tres pacientes esta reducción fue estadísticamente significativa (Kothari y Duggal, 2002).

Recientemente, diversos investigadores han usado el citrato de sildenafil como una alternativa respecto a las terapias tradicionales enfocadas a la dilatación de la vasculatura pulmonar (Buck, 2004). El citrato de sildenafil es un vasodilatador pulmonar efectivo en pacientes que sufren de hipertensión pulmonar arterial, hipertensión pulmonar trombo-embólica (Ardeschir *et al.*, 2002), e hipertensión pulmonar severa debido a que disminuye la resistencia vascular pulmonar (PPH) en humanos (Michelakis *et al.*, 2002). El sildenafil incrementa la vasodilatación pulmonar producida por el ON en animales despiertos con hipertensión pulmonar inducida por un vasoconstrictor (Shekerdemian *et al.*, 2004).

Cada vez son más los reportes que revelan el uso de sildenafil y otras PDE tipo 5, en el tratamiento de hipertensión pulmonar (Shekerdemian *et al.*, 2004), debido a la conveniencia de administrar dosificaciones orales que relativamente tienen pocos efectos adversos, además de que los costos son substancialmente menores comparados con otros agentes (Buck, 2004). En un estudio reciente, se reportó que el sildenafil administrado por vía oral inhibe la hipoxia inducida en modelos animales que cursaron por un proceso de hipertensión pulmonar crónica (Shekerdemian *et al.*, 2004). De igual forma, hay reportes que señalan el uso de sildenafil en el tratamiento clínico de hipertensión pulmonar primaria en niños y adultos (Ardeschir *et al.*, 2002; Shekerdemian *et al.*, 2004). Por otro lado, un estudio realizado en 24 cerdos domésticos de 12 a 16 semanas de edad tuvo como objetivo examinar los efectos del sildenafil sobre la hemodinámica e intercambio gaseoso pulmonar, la administración de 50 y 100 mg de sildenafil resultó en una disminución de la presión parcial de oxígeno (PaO₂), en tanto que la administración de 25, 50 y 100 mg, estimularon la hemodinámica pulmonar en cerdos anestesiados entubados y con ventilación artificial (Kleinsasser *et al.*, 2001).

Después de la administración de sildenafil, se ha observado un tiempo de respuesta inicial de 15 min que se extiende de 45 a 60 min posteriores a su administración (Ardeschir *et al.*, 2002). Sin duda alguna, existe una amplia diversidad

en las dosis de citrato de sildenafil aplicadas durante el tratamiento de hipertensión pulmonar (Shekerdemian *et al.*, 2004), esta puede ser la razón por la que el tiempo de repuesta de vasodilatación que ejerce el sildenafil varía. Basados en algunos casos clínicos reportados y estudios dirigidos con el uso de sildenafil a la fecha, se recomienda a pacientes pediátricos con hipertensión pulmonar una dosis inicial de 0.25 a 0.5 mg/Kg vía oral cada 4 u 8 h, mientras que para adultos con hipertensión pulmonar, el sildenafil puede ser administrado a una dosis de 25 mg cada 6 o 8 h (Buck, 2004). No obstante, es necesario realizar más investigaciones a fin de desarrollar un régimen óptimo respecto a la dosificación y establecer así con más precisión la eficiencia del sildenafil.

Una alternativa novedosa, es la administración combinada de sildenafil oral y óxido nítrico inhalado, éstos actúan sinérgicamente causando una potente vasodilatación pulmonar en pacientes con hipertensión pulmonar arterial e hipertensión pulmonar trombo-embólica (Michelakis *et al.*, 2002). Sin embargo, al comparar el efecto vasodilatador pulmonar del citrato de sildenafil con el óxido nítrico i. en pacientes con hipertensión pulmonar, y al evaluar la dosis-respuesta, la administración oral de 12.5 mg o 50 mg de sildenafil resultó en una disminución de la presión arterial pulmonar y en una dosis-dependiente (Ardeschir *et al.*, 2002). Así mismo, se ha observado que el citrato de sildenafil también produce efectos colaterales sistemáticos importantes en humanos y animales al combinar su uso con nitratos. En un experimento se co-administraron óxido nítrico y sildenafil, observando hipotensión en humanos que habían recibido ON previo a la administración del sildenafil (Wareing *et al.*, 2005). En un estudio realizado en animales que habían sido tratados con ON y 1 mg/Kg de sildenafil, se observaron fallas en la presión sanguínea, hipotensión y una correspondiente disminución en el sistema de resistencia vascular (svr). La respuesta de vasodilatación es más marcada en pacientes que recibieron sildenafil comparada con la administración de óxido nítrico i. en los mismos pacientes (Ardeschir *et al.*, 2002; Shekerdemian *et al.*, 2004).

3. Equilibrio ácido base en el recién nacido asfíctico; aspectos relevantes de la gasometría sanguínea en humanos, cobayos y ratas

La hipoxia, hipercapnia y acidosis metabólica, secundarios al metabolismo anaeróbico son características esenciales de la asfixia. La evaluación de dichos parámetros a partir de sangre arterial de cordón umbilical al nacimiento en bebés y animales, ha permitido evaluar la severidad del grado de asfixia intra-parto, y ha sido correlacionado con indicadores fetales intra-parto, tales como patrones de la frecuencia cardiaca fetal, determinación de gases sanguíneos del cuero cabelludo y escala de Apgar (Villanueva-García *et al.*, 2006). En medicina, la acidosis respiratoria es descrita frecuentemente como el incremento predominante de $p\text{CO}_2$. Mientras que la acidosis metabólica es provocada por el incremento de ácido láctico; sin embargo, mientras que la acidosis fetal aguda es inicialmente respiratoria, ésta es seguida rápidamente por la mezcla de acidosis respiratoria y metabólica si no hay mejora en la oxigenación. Los gases en sangre obtenidos en el periodo perinatal inmediato ayudan a evaluar el proceso de asfixia. La determinación de gases en sangre arterial y de $p\text{CO}_2$ proporcionan la mayoría de determinaciones acertadas respecto a la ventilación alveolar adecuada. Un sin fin de técnicas para realizar la obtención de sangre han sido usadas con diferente grado de éxito, entre ellas están: muestreo venoso, arterial, capilar y trans-cutáneo. Razón por la cual, debe ponerse atención al sitio, tiempo y momento del muestreo, así como del posible diagnóstico.

3.1. Gasometría sanguínea de cordón umbilical en neonatos

Los eventos de la asfixia durante el nacimiento, tales como presencia de acidosis metabólica, hiperlactemia e hipoxia, son comunes (English y Wilkinson, 1982; Herpin *et al.*, 1998); estos indicadores interactúan entre sí perturbando el comportamiento y termorregulación postnatal en el neonato, afectando la supervivencia neonatal (Herpin *et al.*, 1996). La duración y grado de asfixia fetal en neonatos humanos causa

morbilidad fetal y neonatal así como mortalidad (James *et al.*, 1958). Nelson *et al.* (1996; citado por Brouillette y Waxman, 1997), reportan que una de las consecuencias de haber cursado por un proceso de asfixia perinatal, resulta en 10 a 20% de casos con parálisis cerebral en niños. La hipoxia, hipercarponia (acidosis respiratoria) y acidosis metabólica (frecuentemente medida por el déficit de base) secundarios al metabolismo anaeróbico, son características esenciales de la asfixia (Villanueva-García *et al.*, 2006). La evaluación de dichos parámetros a partir de sangre arterial de cordón umbilical al nacimiento, en bebés y animales, ha permitido evaluar la severidad del grado de asfixia intra-parto (James *et al.*, 1958), y ha sido correlacionada con indicadores fetales intra-parto, tales como patrones de la frecuencia cardiaca fetal, determinación de gases sanguíneos del cuero cabelludo, y la escala de Apgar (Strickland *et al.*, 1984).

La sangre obtenida del cordón umbilical en neonatos humanos, proporciona información suficiente para conocer la relación existente entre el exceso de base, cambios en las concentraciones de pO_2 , saturación de O_2 , pCO_2 y pH debido al intercambio continuo de gases sanguíneos en la placenta (Nodwell *et al.*, 2005). El conocimiento y la interpretación de los gases en sangre proporcionan información importante sobre el estado del paciente después del nacimiento (Brouillette y Waxman, 1997), y pueden ayudar tanto a clínicos e investigadores en la evaluación, manejo ante-parto y cuidado postnatal del neonato (Strickland *et al.*, 1984). Sin embargo, el muestreo sanguíneo de cordón umbilical algunas veces es limitado debido a la obtención de volumen insuficiente de sangre al nacimiento (Nodwell *et al.*, 2005).

El resultado de los valores normales en sangre de arteria y vena umbilical en neonatos humanos son diferentes. Para la sangre arterial umbilical se describe un pH: 7.27, pO_2 : 18 mmHg, pCO_2 : 50 mmHg, bicarbonato: 22 mEq/l y EB: -3 mEq/l; para la sangre de vena umbilical, pH: 7.34, pO_2 : 28 mmHg, pCO_2 : 41mmHg, bicarbonato: 21 mEq/l y EB: -2 mEq/l (Hübner, 2001). Arikan *et al.* (2000), señalan valores en vena umbilical para SaO_2 : $51.6 \pm 18.4\%$, pH: 7.33 ± 0.07 , EB: -3.92 ± 2.28 mmol/L y en arteria umbilical, SaO_2 : $26.0 \pm 16.9\%$, pH: 7.24 ± 0.08 y EB: -4.78 ± 2.28 mmol/L. La diferencia en las concentraciones entre arteria y venas umbilicales sugiere que la circulación

placentaria elimina el lactato de la sangre fetal ayudando a compensar el déficit del oxígeno fetal

3.2. Importancia de la gasometría en perinatología

La medición de gases en sangre complementadas con técnicas de monitoreo no invasivas proporcionan información clínica esencial en pacientes que están siendo evaluados para tomar alguna decisión terapéutica. Estos datos son importantes en recién nacidos enfermos y otros pacientes críticos, debido a que cambian su fisiología rápidamente. El acceso a arterias o venas para realizar el muestreo sanguíneo, en algunas ocasiones suele dificultarse por ende, el resultado es la obtención de pequeños volúmenes sanguíneos que presentan cambios únicos (Hernández-González *et al.*, 2006).

En perinatología humana la medición de gases en sangre (pO_2 , pCO_2) y pH, además de técnicas complementarias a través del monitoreo no invasivo, proporcionan información esencial para evaluar al paciente, tomar la decisión terapéutica y realizar un diagnóstico correcto (Nodwell *et al.*, 2005). Aunado a esto, los valores de mediciones de gases sanguíneos de arteria umbilical sirven también para identificar a los neonatos que necesitan cuidado neonatal adicional, y proporcionan una excelente herramienta de evaluación retrospectiva para preservar la salud neonatal durante el nacimiento (Williams y Singh, 2002). Cabe señalar que los valores normales de gases sanguíneos arteriales son dependientes del tiempo de vida postnatal.

Un sin fin de técnicas para realizar la obtención de sangre han sido usadas con diferente éxito, entre ellas están: muestreo venoso, arterial, capilar y trans-cutáneo. Por lo tanto, debe ponerse particular atención al sitio de muestreo, tiempo de vida y al posible diagnóstico (Brouillette y Waxman, 1997). Es necesario mencionar que estas técnicas de evaluación hace algunas décadas eran exclusivas del área de medicina humana, sin embargo desde la introducción de animales de laboratorio (rata y cobayo por mencionar algunos) en la década de los 1950's, se han diseñado diversas técnicas no invasivas de muestreo sanguíneo. Estudios recientes realizados por Orozco

et al. (2007), han utilizado con éxito algunas de estas técnicas en el área de perinatología veterinaria.

3.3. Obtención de gases en sangre

Frecuentemente la sangre es requerida en numerosos proyectos de investigación que involucran especies animales bajo experimentación, su obtención es uno de los procedimientos más comunes en animales de laboratorio y humanos, las técnicas usadas deben ser refinadas debido a que el estrés causado en el individuo a muestrear puede afectar las variables fisiológicas (Hernández-González *et al.*, 2006).

Las muestras de sangre en animales pueden ser obtenidas de varios sitios del cuerpo, el método a emplear dependerá de diversos factores usando una variedad de métodos en venas, arterias o por punción cardiaca, punción del seno orbital o decapitación (Hem *et al.*, 1998). En la actualidad, la colección de sangre en animales se realiza bajo los efectos de algún anestésico a fin de asistir la inmovilización y disminuir el estrés causado, proporcionando así información más acertada en los resultados cuando se trata de gasometría sanguínea. No obstante, aún queda pendiente determinar los efectos del anestésico sobre los valores resultantes de la química sanguínea.

Respecto al uso de los anestésicos, el pentobarbital sódico es una droga usada en el tratamiento de epilepsia en caninos, felinos y humanos, aunque de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO, la sobre-dosificación de este fármaco puede ser usada comúnmente para sacrificar animales bajo experimentación incluyendo a los roedores. Demir *et al.* (2001), evaluaron el efecto del pentobarbital sobre los parámetros de gases en sangre en ratón concluyendo que causa depresión respiratoria y disminución de la actividad superoxidasa dismutasa en tejido cerebral, y ambas pueden causar acidosis respiratoria temporal, el análisis de gases en sangre demostró que los niveles de pH y pO₂ disminuyeron severamente.

A diferencia del ser humano adulto, el muestreo sanguíneo en el cobayo resulta difícil debido a su tamaño y forma compacta. Sin embargo, anatómicamente muchos sitios son accesibles para realizar el muestreo si se tienen los conocimientos

necesarios. Las técnicas de muestreo sanguíneo comúnmente usadas son vena cava anterior para la colección de grandes cantidades, cardiocentesis, seno retro-orbital y vaso femoral para volúmenes de sangre moderados (Terril y Clemons, 1998).

En la rata se recomienda la punción de la vena en la cola, mientras que la punción retro-orbital es muy usada, la punción en la vena sublingual ha sido reportada con poca frecuencia ya que este método requiere anestesia general y su uso puede resultar en una reducción del consumo de alimento. Otra técnica como la punción en vena safena de la rata también ha sido empleada solo que esta técnica es más compleja y necesita de dos operadores (Hem *et al.*, 1998).

3.4. Desequilibrio ácido-base y perfil metabólico del recién nacido

Durante la vida intrauterina y el proceso del parto, los fetos dependen totalmente de su madre respecto al intercambio placentario de oxígeno y bióxido de carbono. Dicho intercambio mantiene las concentraciones adecuadas de gases en sangre materna, aporte sanguíneo uterino, transferencia placentaria, y transporte de gases fetales; la interrupción de cualquiera de estos factores puede ocasionar hipoxia fetal, que a su vez puede causar acidosis a pesar de los mecanismos compensatorios (Bobrow y Soothill, 1999). La acidosis metabólica y respiratoria también pueden originarse como consecuencia del estrés aún de un parto normal en el cual ocurre cierto grado de hipoxia tisular e insuficiencia placentaria (Brouillette y Waxman, 1997). Cuando la transferencia de O₂ se restringe, posiblemente por compresión del cordón umbilical, resulta imposible completar el metabolismo de carbohidratos a CO₂ y agua, por lo tanto, el metabolismo fetal se realiza a través de vías anaeróbicas acumulando un exceso de ácido láctico. El aumento de lactato durante la asfixia, se da por un incremento en la producción del metabolismo anaeróbico (Soothill *et al.*, 1987). Cuando los iones de H⁺ reaccionan con el bicarbonato de la sangre fetal, se registra una disminución en la concentración de bicarbonato y un descenso el pH, mismo que regularmente se mantiene dentro de un rango estrecho por diversos sistemas de amortiguación en el cuerpo. Sin embargo, un valor anormal es provocado por una

compensación ácido-base deficiente o por trastornos metabólicos y respiratorios ocasionando un desequilibrio en la misma dirección (Orozco *et al.*, 2007).

Herpin *et al.* (1998), señalan que se observó una disminución repentina en los niveles de pH y glucosa en sangre, simultánea a un incremento significativo de PaCO₂ y niveles de lactato, en lechones a los que se les impidió la respiración en los primeros 4 minutos de vida postnatal.

En medicina humana, la acidosis respiratoria es descrita frecuentemente como un incremento predominante de pCO₂, y la acidosis metabólica es provocada por un incremento de ácido láctico. Sin embargo, mientras que la acidosis fetal aguda es inicialmente casi siempre respiratoria, ésta es seguida rápidamente por la mezcla de acidosis respiratoria y metabólica si no hay mejora en la oxigenación (Villanueva-García *et al.*, 2006).

Acidosis significa una alta concentración de iones hidrógeno en tejidos, mientras que acidemia se refiere a la alta concentración de iones hidrógeno en sangre y es la medición que indica la acidosis tisular con mayor facilidad. Otro indicador empleado algunas veces para evaluar acidosis es el exceso de base o bicarbonato (HCO₃⁻) (Bobrow y Soothill, 1999). Low *et al.* (1997), revisaron el papel del tipo de acidosis para determinar la incidencia de complicaciones en neonatos humanos al parto, y de esta forma definir la acidosis metabólica como un déficit de base mayor a 16 mmol/L, y acidosis respiratoria con pCO₂ mayor a 75 mmHg sin déficit de base en arteria umbilical de 16 mmol/L o menos. Sugiriendo que el déficit de base es el mecanismo más apropiado para evaluar el riesgo de complicaciones en recién nacidos.

Los neonatos poseen la habilidad para compensar la acidosis, la compensación es la primera respuesta al desorden, cuyo objetivo es regresar al pH tan cerca como sea posible al neutral (Brouillette y Waxman, 1997), además la respuesta a la hipoxia está influenciada por factores que incluyen reservas fetales, madurez y crecimiento fetal. Algunos fetos pueden tolerar baja saturación de oxígeno sin una disminución en el exceso de base. La acidosis es el reflejo más sensible de la asfixia, la ausencia de acidemia indica que no hubo asfixia. En la literatura, los límites abajo de lo normal para

el pH de arteria umbilical y exceso de base en neonatos humanos, son 7.04–7.10 y -12 mmol/L, respectivamente (Arikan *et al.*, 2000).

Uno de los mecanismos que utiliza el feto al cursar por un proceso de desequilibrio ácido-base, es la compensación renal que generalmente no es completada pero que causa retención de bicarbonato, regresando el pH a sus valores normales, el pH permanece a <7.40 (Villanueva-García *et al.*, 2006). Los diuréticos son empleados para mejorar los mecanismos pulmonares, disminuyen el agua en pulmón y favorecen el intercambio de gases. La tiazida y otros diuréticos resultan en pérdida de cloro, potasio, sodio y retención de bicarbonato. La administración de dosis elevadas de diuréticos y sin reemplazo de sales, puede resultar en alcalosis metabólica, con valores de pH >7.40. Bajo estas circunstancias el ritmo respiratorio puede disminuir, resultando en hipoventilación. Algunas estrategias que pueden ser usadas para reducir el bicarbonato plasmático y minimizar el problema son: disminución de la dosis de diuréticos, cambio de un LOOP por un diurético de tipo tiazida, reemplazo de sales o uso de acetazolamida (Brouillette y Waxman, 1997).

Por otro lado, recientemente en un estudio retrospectivo realizado en neonatos a término, con sospecha de haber tenido un grado de asfixia intra-parto significativo, observaron que los niveles arteriales de lactato obtenidos en la primer hora de nacidos, antes del restablecimiento de la acidosis metabólica con bicarbonato de sodio, son predictores importantes de encefalopatía hipóxico-isquémica de moderada a severa (Shah *et al.*, 2004).

La temperatura corporal postnatal de neonatos que han cursado por un proceso de asfixia, disminuye probablemente por falta de energía debido a la termorregulación, provocando a su vez disminución del vigor y consumo de calostro (Herpin *et al.*, 1998). Con relación a la temperatura corporal, existe un efecto directo sobre el metabolismo tisular, alteración del metabolismo de carbohidratos y reducción en el suministro de O₂ a los tejidos; generalmente están asociados con hipotermia, reducción de la eficiencia del trabajo y fatiga muscular provocada por acidosis, estos son mecanismos para regular el enfriamiento corporal sobre el metabolismo energético del neonato (Lossec *et al.*, 1998).

Recientemente Orozco *et al.* (2007), utilizando un modelo porcino, señalan que durante el primer minuto de vida, los valores de pH y temperatura fueron significativamente elevados en lechones sin evidencia de asfixia en comparación con lechones nacidos asfixiados. Respecto a los niveles plasmáticos de glucosa, calcio, lactato y pCO₂, éstos fueron significativamente mayores en el grupo de lechones sobrevivientes a un episodio de asfixia, respecto al grupo testigo.

3.4.1. Alternativas para restablecer el equilibrio ácido base en el recién nacido con asfixia. Los valores de PaO₂ y SaO₂ pueden ser bajos en neonatos humanos prematuros debido a una reducción en la tensión de oxígeno inspirado, que causa una disminución en la función pulmonar (Brouillette y Waxman, 1997). Un método novedoso para lograr mantener una adecuada PaO₂ y SaO₂ y minimizar el gasto cardiaco así como el gasto respiratorio, es a través de la utilización de la terapia con oxígeno en el neonato (Brouillette y Waxman, 1997). Estudios realizados por Herpin *et al.* (2001), indican que después de 2 o 3 minutos de inhalación de oxígeno (controlado en cámara de O₂), incrementa la pO₂ sanguínea, debido a que la tensión de O₂ en arterias aumenta, evitando así el incremento en los niveles de lactato en sangre.

Por otro parte, la inhalación de oxígeno en cerdas durante el parto vía catéter nasal resulta efectiva, al incrementar la concentración de oxígeno en el feto durante el parto (Zaleski y Hacker, 1993). Sin embargo, en la práctica común este tratamiento no mejora la viabilidad neonatal de lechones. Herpin *et al.* (2001), mencionan que la inhalación de oxígeno en cerdas durante el parto, modifica el metabolismo de los lechones por medio de la estimulación del metabolismo oxidativo (reducción de niveles circulantes de lactato), y evita bajos niveles de hipotermia postnatal (particularmente en lechones de bajo peso).

Tollofsrud *et al.* (2001), demostraron que es posible la reoxigenación eficiente con cámaras de ventilación (100% O₂) en lechones recién nacidos expuestos a hipoxemia, seguido por aspiración de meconio, evaluados en términos de presión arterial sanguínea, presión arterial pulmonar, índice cardiaco, déficit de base e hipoxantina plasmática. Los autores señalaron que el grado de madurez de los lechones

probablemente es más importante que el peso corporal. Por otro lado, aunque la administración de oxígeno puede no evitar la aparición de hipotensión sistémica en el daño por aspiración de meconio y asfixia severa, la hipertensión pulmonar hipoxémica se supone, protege a los órganos del recién nacido en contra del daño oxidativo durante los intentos de resucitación después de la asfixia al nacer (Aaltonen *et al.*, 2003).

El uso reciente de óxido nítrico para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en recién nacidos y pacientes adultos mayores, ha suscitado atención especial en la metahemoglobinemia. El óxido nítrico inhalado se une rápidamente a la hemoglobina en la circulación pulmonar, resultando en relajación selectiva del músculo liso vascular pulmonar. El complejo óxido nítrico-hemoglobina es convertido a metahemoglobina, y las concentraciones de óxido nítrico tóxicas pueden resultar en metahemoglobinemia. A la fecha, la metahemoglobinemia no ha sido un problema serio en neonatos que recibieron de 5 a 80 ppm de óxido nítrico inhalado (Brouillette y Waxman, 1997). El descubrimiento del ON ha revolucionado el tratamiento de hipertensión pulmonar aguda, ya que produce vasodilatación pulmonar en regiones ventiladas de pulmón (Shekerdemian *et al.*, 2004).

Otra solución interesante en neonatos que han cursado por un proceso de asfixia podría ser a través del incremento de ON por la vía GMPc. Uno de los propósitos de la presente tesis fue intentar mejorar el crecimiento de órganos en fetos extraídos de cobayas tratadas con citrato de sildenafil, de tal forma que haya un incremento en la tolerancia a la asfixia perinatal inducida.

III. OBJETIVOS

General

- Evaluar el crecimiento fetal y perfil biofísico del feto que ha cursado por un proceso de asfixia perinatal inducida, nacido de cobayas tratadas con citrato de sildenafil durante el último tercio de la gestación.

Específicos

- Determinar los perfiles sanguíneos de pH, pCO₂ y pO₂ (mmHg), Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (mmol/L), y lactato con un analizador de gases en sangre, de fetos que cursaron por un proceso de asfixia perinatal inducida por pinzamiento del cordón umbilical, y de cobayos (fetos) sin evidencia clínica de sufrimiento fetal agudo a fin de determinar si el feto de la madre tratada con citrato de sildenafil tiene mayor capacidad de resistir la asfixia perinatal.
- Determinar el perfil de glucosa al nacimiento de fetos que cursaron con asfixia perinatal inducida.
- Evaluar la relación que existe entre la regulación de la temperatura corporal del feto con la determinación de glucosa en sangre.
- Establecer el grado de asfixia perinatal a través del perfil metabólico.
- Establecer el grado de correlación entre los indicadores de asfixia perinatal y el desarrollo corporal de los fetos obtenidos de los 3 tratamientos a través de la morfometría y pesaje de los órganos.

IV. HIPOTESIS

- El uso del citrato de sildenafil promueve el crecimiento fetal, mejora los indicadores de intercambio gaseoso y lactoacidemia, y puede representar una alternativa para que los fetos durante el último tercio de gestación tengan un mejor crecimiento orgánico que les permita tolerar en mayor grado la asfixia perinatal.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de animales y localización

Los animales bajo estudio fueron cobayos (*Cavia porcellus*) de pelo corto pigmentados, sin signos clínicos de enfermedad (Foto 1), su estancia fue en el Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran bajo condiciones controladas.

1.1. Condiciones de alojamiento. Los animales fueron alojados en contenedores de polipropileno con piso sólido y cama tipo virutas (Aspen Shavings®) (Foto 2), a una densidad poblacional de 0.66 m² por animal, temperatura ambiental de 22°C ± 2°C, humedad relativa promedio de 50±10 % (Foto 3), ventilación de 20 recambios de aire/hora con ciclos de iluminación controlada de 12 horas luz/12 horas de oscuridad (Foto 4). Se les proporcionó alimento balanceado en forma de pellet, de la marca comercial Harlan Tekland Global Diets con 18% de proteína cruda, 3.5% de grasa cruda y 13% de fibra cruda. Se les proporciono alimento a libre acceso todos los días durante las mañanas (8:00 am) y tardes (3:00 pm), en comederos de acero inoxidable tipo “j”. Asimismo, se les proporcionó agua potable *ad libitum* en botellas de polipropileno provistos de pipetas con balines de acero inoxidable para impedir derrames accidentales (Foto 2).

1.2. Número de animales y formación de grupos. Cuarenta y tres cobayos, hembras multíparas fueron alojadas bajo un sistema de Harem por cinco días, durante este periodo algunas hembras presentaron estro y se aparearon con los machos. Los animales fueron manejados de acuerdo a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Durante los 5 días de alojamiento, las hembras fueron revisadas en orden y se identifico la presencia de un tapón vaginal con la finalidad de corroborar la monta y eyaculación. Se consideró el día uno de gestación cuando se

observó el tapón vaginal. Treinta y cinco días después, los animales fueron pesados y examinados por palpación abdominal a fin de confirmar la presencia de gestación (Foto 5). El incremento del peso corporal durante el periodo de alojamiento también fue usado como un indicador de gestación.

Se identificaron 22 animales gestantes. De estos, 20 fueron designados de forma aleatoria a 3 diferentes grupos por medio del diseño de una tabla de números al azar.

2. Tratamiento

El citrato de sildenafil (Viagra®, Pfizer, Sandwich, UK), fue adquirido en forma comercial (tabletas) a una concentración de 50 mg bajo condiciones asépticas (Foto 6), las tabletas fueron maceradas en un mortero y diluidas en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de solución salina estéril (Foto 7). El volumen correcto fue obtenido a través de una jeringa con capacidad de 1 ml y fue administrada por vía oral día a día a las hembras bajo estudio (esquema 1). La dosis fue ajustada de acuerdo al peso de los animales y permaneció sin cambios por una semana. Los animales del grupo testigo (n=10) recibieron solución salina estéril, mientras que el grupo 2 (n=5) y 3 (n=5) recibieron citrato de sildenafil a diferentes dosis de 50 y 500 µg/kg, respectivamente. El sildenafil fue administrado diariamente a las 10:00 horas, incluyendo los fines de semana, iniciando a partir del día 35 de gestación hasta el día de la cesárea (Foto 8).

3. Cesárea

De acuerdo a Hernández-Gonzalez *et al.* (2006), la duración total de la gestación de las cobayas es muy variable de 59 a 72 días. Por esta razón, los animales fueron revisados intencionalmente a partir del día 50, en la mañana (entre 7 y 8 am) y en la tarde (de 1 a 3 pm), la duración de la gestación de los animales utilizados en este experimento también fue muy variable, de 51 a 67 días. Se consideró el último día de gestación cuando la apertura de la sínfisis pubiana era mayor a 1 cm.

El proceso de parto en las cobayas inicia con la dilatación de la sínfisis pubiana. Si se identificaba la dilatación del pubis y ésta era mayor a 1 cm, los animales eran

pesados casi inmediatamente y sometidos a una cirugía por cesárea 2 horas después. El peso (kg) de las madres al inicio (día 35 post-monta) y al final del periodo de tratamiento fueron obtenidos por una báscula electrónica con una capacidad de 0.01 a 10 kg (Salter, Brecknell Weighing Products, USA).

De forma simultánea se administro 50 mg/kg de Ketamina y 3 mg/kg de Xilazyna por vía intraperitoneal (Foto 9). Los animales fueron alojados en una caja de propileno esterilizada mientras se llevaba a cabo la pérdida de consciencia (Foto 10). Posteriormente, la superficie abdominal fue roseada con una solución yodada y limpiada con una gasa estéril (Esquema 1). Los animales fueron colocados en una mesa de cirugía para animales (pequeñas especies) y fueron inmovilizados de sus 4 extremidades. El área abdominal baja fue rasurada. Una vez confirmada la ausencia de reflejos en los animales, se realizó una incisión abdominal de 2 a 3 cm (Foto 11), entonces los cuernos uterinos fueron cuidadosamente expuestos y una incisión en cada cuerno fue realizada. Por conveniencia, para ser ordenados y homogéneos durante el procedimiento quirúrgico, se decidió abrir en primera instancia el lado izquierdo, de forma manual se obtuvieron a cada uno de los fetos a través de la presión cautelosa de los cuernos (Foto 12) y fueron separadas las membranas placentarias manteniendo el cordón umbilical conectado a la placenta. Durante el procedimiento quirúrgico, se creó un medio ambiente artificial que mantuvo la temperatura corporal de los fetos a 37 °C.

3.1. Inducción de la asfixia y muestreo sanguíneo. Después de un periodo de 20 a 30 segundos posteriores a la extracción de los fetos de la cavidad uterina, una muestra de sangre de 1 ml fue obtenida por punción cardiaca a través de una aguja estéril calibre 23Gx1"en (Foto 13). Parte de la sangre obtenida fue transferida a un micro-capilar preparado previamente con heparina de litio, con capacidad de 150- μ l para ser analizada por un gasómetro (GEM premier 3000, IL Diagnostics SA de CV, México DF, México) (Foto 14), después del análisis fueron obtenidos el pH, pCO₂ y pO₂ (mmHg), Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (mmol/L), glucosa (mg/dL) y lactato (mg/dL). Después del muestreo sanguíneo, se indujo la asfixia perinatal por compresión del cordón umbilical (Esquema 1), la oclusión fue realizada con pinzas hemostáticas por un periodo de 5

minutos (Foto 15). Se realizó la valoración de viabilidad neonatal a través del conteo de tiempo desde el momento del pinzamiento hasta la presencia del primer intento de inspiración, posteriormente se realizó el conteo de los intentos de inspiración hasta que concluyeron los 5 minutos de asfixia perinatal inducida. En el último minuto de asfixia, un segundo muestreo (1 ml) fue obtenido por punción cardiaca en un periodo de 20 a 30 segundos. Las muestras fueron obtenidas y analizadas en el mismo orden por el gasómetro descrito previamente, obteniendo las variables antes mencionadas. Cuando las pinzas hemostáticas fueron removidas del cordón umbilical, se realizó el corte de este y la placenta fue cuidadosamente extraída después de que todos los fetos fueron obtenidos. Después de la extracción de los fetos, las madres fueron sacrificadas por una sobredosis de pentobarbital sodico de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO, Sacrificio Humanitario de los animales domésticos y salvajes.

El número de fetos que tuvieron respiración espontánea y movimientos (animales que sobrevivieron) al final de los 5 minutos de asfixia fue registrada. Los fetos que sobrevivieron fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital sodico vía punción cardiaca. Los fetos que no presentaron respiraciones durante el periodo de asfixia, también recibieron una sobredosis de pentobarbital sodico.

4. Zoometría y morfometría

A fin de evaluar el crecimiento fetal y caracterizar la zoometría del feto, se realizaron mediciones zoométricas en los cadáveres. Los siguientes parámetros fueron obtenidos: peso a la extracción (g) (Foto 16), longitud de la cabeza a la base de la cola o largo dorsal (cm) (Foto 17), ancho de cabeza (Foto 18) y grupa (cm) (Foto 19), perímetro torácico y abdominal (cm), perímetro de cañas anterior y posterior (cm) en una de las extremidades distales abdominal y torácica. El ancho fue obtenido por un calibrador vernier mientras que los otros parámetros somatométricos fueron obtenidos con cinta métrica.

Los órganos incluyeron corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones y cerebro, al respecto, estos fueron removidos (Foto 20) y pesados pares de órganos, ej. pulmones

o riñones (Esquema 1). El peso de la placenta, fetos y sus órganos fueron obtenidos por una balanza con una capacidad de 0.1 – 1,000 g (Ohaus, Scale Corporation, Florham Park, New Jersey, USA).

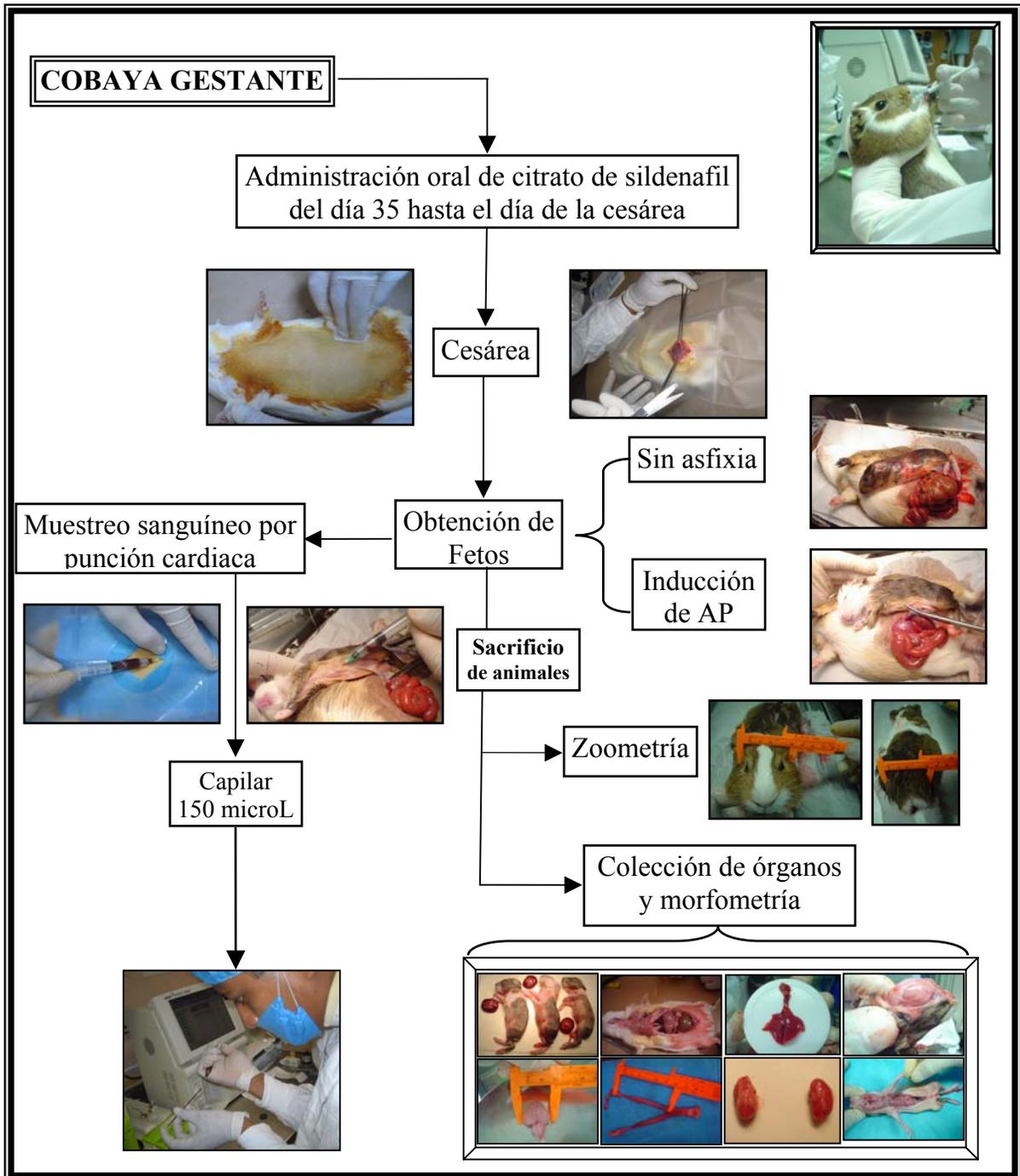
Finalmente, se realizó la disección del útero en las madres sacrificadas, a fin de obtener el largo del útero con un calibrador vernier (Esquema 1), posteriormente se realizó el pesaje de este con una balanza (Ohaus, Scale Corporation, Florham Park, New Jersey, USA).

5. Variables observadas

Los indicadores neonatales observados fueron: número de cobayos extraídos por hembra, presencia de latidos cardiacos, número de movimientos inspiratorios y latencia a intentos de inspiración durante la asfixia perineal inducida. El seguimiento de la cesárea, pesaje y medición de órganos, fue a través del llenado de una hoja de registros (Anexo 3).

6. Análisis estadísticos

En cada grupo de estudio, los datos fueron resumidos como media \pm desviación estándar, mediana (y rangos), o bien como el número de casos observados (%). Debido a que el número de madres incluidas en el estudio fue diferente (10 en el grupo testigo y 5 en cada grupo de tratadas con diferentes dosis de sildenafil), los parámetros fueron comparados entre los 3 grupos por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por una comparación de la prueba Conover-Inman (una prueba de Fisher simple). Las variables categóricas fueron comparadas entre los 3 grupos por una prueba de X^2 para grupos múltiples. Para las variables relacionadas a la vitalidad y a los indicadores reproductivos, se realizó una prueba de ANDEVA. El análisis estadístico fue realizado con el StatsDirect 2.4.5 (StatsDirect Ltd., Cheshire, United Kingdom) por uno de los investigadores ignorando la distribución de los datos en los grupos. El límite de significancia fue fijado con una prueba de 2 colas y un nivel de significancia de $P < 0.05$.



Esquema 1.- Representación general de la metodología empleada antes, durante y después de la cesárea en cobayas.

VI. RESULTADOS

Treinta y cinco días después de haber identificado el tapón vaginal, la gestación fue confirmada y los animales fueron alojados de forma aleatoria a cada uno de los tratamientos, el peso de las madres fue de aproximadamente 0.7 kg en los tres grupos de estudio ($P=0.6$). Los animales en los tres grupos de tratamiento incrementaron su peso corporal en aproximadamente 0.3 kg ($P=0.4$). Respecto al peso corporal de los fetos a término obtenidos de madres tratadas con 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sildenafil, estos fueron más pesados ($P<0.001$) y más largos ($P=0.004$) que los fetos obtenidos de los otros dos grupos (Cuadro 2). Los fetos obtenidos de madres tratadas con 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sildenafil, presentaron ancho de cabeza y de grupa más amplias ($P=0.001$), a diferencia de lo registrado en los grupos testigo y con dosis baja de sildenafil. Los valores del largo dorsal, ancho de cabeza, ancho de grupa y peso de los fetos a término obtenidos de cobayas incluidas en el grupo testigo fueron similares a los observados en los fetos de madres tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sildenafil.

Los pesos ajustados a $\text{mg}/10\text{ g}$ del peso corporal del corazón y pulmones, fueron significativamente más elevados ($P<0.05$) en el grupo de fetos extraídos de cobayas tratadas con dosis alta de sildenafil (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) respecto a las mismas variables observadas en el grupo testigo, en contraste, no hubo diferencias de estos pesos entre el grupo testigo y el grupo con dosis baja de sildenafil (Cuadro 3). No hubo diferencias en ninguna de las variables mostradas en el cuadro 3 entre los grupos testigo y dosis baja de sildenafil. En relación al peso de los bazo, estos fueron aproximadamente 50% más ligeros en el grupo con dosis alta de sildenafil que los pesos observados en los otros dos grupos (dosis baja y alta de sildenafil). Respecto a los riñones, estos fueron significativamente más pesados ($P<0.05$) en el grupo tratado con 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sildenafil a diferencia de lo observado en los grupos testigo y dosis baja de sildenafil. El peso del hígado, cerebro y placenta fue similar en los tres grupos de estudio (Cuadro 3).

Antes de la compresión del cordón umbilical, los niveles de glucosa en sangre fueron elevados en el grupo de fetos incluidos en el grupo testigo y grupo con dosis baja en comparación al grupo con dosis alta de sildenafil (Cuadro 4). Sin embargo, estas diferencias no fueron observadas entre los fetos en los tres grupos de tratamientos. Aproximadamente el 20% de los fetos extraídos de madres incluidas en el grupo testigo, no sobrevivieron a la asfixia perinatal inducida, a diferencia de estos resultados, no fue observada ninguna muerte en los grupos tratados con el fármaco (Cuadro 4). De acuerdo a los gases en sangre y electrolitos de fetos que sobrevivieron al proceso de asfixia perinatal inducida, las crías de madres tratadas con dosis elevada de sildenafil (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) tuvieron mayor tolerancia a la asfixia que los fetos a término obtenidos de madres incluidas en el grupo testigo y de fetos extraídos de madres que recibieron una dosis baja de sildenafil (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En los fetos del grupo testigo que sobrevivieron a la asfixia perinatal inducida, los niveles de pH en uno, pCO_2 en dos, lactato en uno y Ca^{2+} en siete animales mostraron niveles incalculables por el gasómetro al estar por debajo del rango de calibración, reflejando entonces la severidad del desbalance en sus metabolitos y electrolitos.

En relación a la vitalidad de los fetos, los hallazgos más relevantes sugieren que los fetos extraídos de madres tratadas con dosis alta de sildenafil mostraron menor tiempo para realizar el primer intento de inspiración ($P<0.05$) respecto a los otros 2 grupos (Cuadro 5). Respecto al número de intentos de inspiración durante el proceso de asfixia perinatal inducida, los fetos del grupo tratado con 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sildenafil tuvieron mayor número de intentos de inspiración ($P<0.05$), a diferencia de lo observado en los grupos testigo y dosis baja de sildenafil, en los que no se encontraron diferencias estadísticas (Cuadro 5).

En relación al crecimiento uterino, el largo del útero únicamente fue mayor en el grupo de cobayas tratadas con dosis alta de sildenafil y solo hubo diferencias significativas al compararlos con el grupo testigo (Cuadro 6). Finalmente, no observamos alguna malformación morfológica en los fetos o sus órganos.

Cuadro 2 Parámetros somatométricos de cobayos al nacimiento expuestos a los efectos maternos por ingesta de sildenafil

	Testigo	Sildenafil		Valor P
		Dosis baja (50 µg/kg)	Dosis alta (500 µg/kg)	
Madres (n)	10	5	5	–
Peso a los 35 días de gestación (kg)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.07	0.7 ± 0.04	0.6
Peso al final de la gestación (kg)	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.06	1.0 ± 0.06	0.6
Ganancia de peso durante la gestación(kg)	0.3 ± 0.08	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.06	0.4
Duración de la gestación (semanas)	8.4 ± 0.8	8.2 ± 0.2	8.4 ± 0.3	0.9
Fetos (n)	37	16	14	–
# de fetos extraídos por hembra	3.7 ± 1.88	3.2 ± 0.83	2.8 ± 0.83	0.640
Peso a término (g)	61.9 ± 21.6	66.3 ± 16.0	90.0 ± 12.7 ^{a,b}	<0.001
Largo dorsal (cm)	9.3 ± 1.0	9.6 ± 1.2	10.6 ± 1.1 ^{a,b}	0.004
Ancho de cabeza (cm)	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.7 ± 1.4 ^{a,b}	0.001
Ancho de grupa (cm)	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2 ^{a,b}	0.001
Perímetro torácico (cm)	8.0 ± 1.0	7.9 ± 1.1	8.8 ± 0.6	0.05
Perímetro abdominal (cm)	7.9 ± 0.9	7.8 ± 1.2	8.7 ± 0.7 ^{a,b}	0.02

^aP<0.05, testigo vs dosis alta de sildenafil; ^bP<0.05, dosis baja vs dosis alta de sildenafil. No hubo diferencias al comparar los parámetros entre el grupo testigo y el grupo con dosis baja de sildenafil.

Cuadro 3 Efecto del sildenafil sobre el peso de los órganos sólidos y de la placenta de fetos extraídos por cesárea

Variables	Testigo	Sildenafil		Valor P
		Dosis baja (50 µg/kg)	Dosis alta (500 µg/kg)	
Fetos (n)	37	14	16	–
Corazón (mg/10g)	62.8 ± 21.2	72.8 ± 27.3	77.5 ± 13.3 ^a	0.03
Pulmones (mg/10g)	211.1 ± 42.1	227.4 ± 29.8	242.7 ± 41.5 ^a	0.04
Hígado (mg/10g)	591.8 ± 131.6	582.7 ± 92.0	597.3 ± 51.4	0.6
Bazo (mg/10g)	21.5 ± 11.9	20.5 ± 7.1	11.3 ± 1.6 ^{a,b}	<0.0001
Riñones (mg/10g)	82.1 ± 33.1	84.0 ± 29.6	102.8 ± 25.5 ^{a,b}	0.03
Cerebro (mg/10g)	360.0 ± 69.5	345.9 ± 29.7	324.0 ± 52.5	0.1
Placenta (g)	5.7 ± 1.4	5.4 ± 0.7	5.6 ± 1.2	0.7

Los fetos incluidos en el grupo testigo fueron extraídos de 10 madres, mientras que en los grupos tratados con sildenafil solo fueron extraídos de 5 madres en cada grupo. ^aP<0.05, grupo testigo vs grupo dosis alta; ^bP<0.05, grupo dosis baja vs grupo dosis alta de sildenafil. No hubo diferencias al comparar los parámetros entre el grupo testigo y dosis baja de sildenafil.

Cuadro 4 Parámetros metabólicos y desequilibrio acido-base de fetos a término expuestos a asfixia perinatal inducida

Variables	Testigo	Sildenafil		Valor P
		Dosis baja (50 µg/kg)	Dosis alta (500 µg/kg)	
Con cordón umbilical conectado a la placenta				
Fetos totales (n)	37	16	14	--
pH	7.0 ± 0.1	7.2 ± 0.09 ^a	7.1 ± 0.09 ^b	0.004
pCO ₂ (mmHg)	75.9 ± 19.3	66.9 ± 18.8 ^a	54.8 ± 13.0 ^{b,c}	0.0005
pO ₂ (mmHg)	6.0 ± 2.9	6.4 ± 3.7	7.8 ± 3.8	0.3
Lactato (mg/dL)	8.3 ± 3.3	4.4 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.6 ^b	<0.0001
Glucosa (mg/dL)	107.1 ± 42.7	120.7 ± 29.0	82.9 ± 38.2 ^c	0.02
Na ⁺ (mmol/L)	128.2 ± 4.5	134.4 ± 4.2 ^a	139.0 ± 4.6 ^{b,c}	<0.0001
K ⁺ (mmol/L)	6.4 ± 2.0	4.8 ± 0.9 ^a	4.7 ± 1.1 ^b	0.004
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2 ^{b,c}	<0.0001
Después de 5 min de asfixia perinatal inducida				
Número fetos vivos/ muertos	30/37	16/16	14/14	
Porcentaje de sobrevivencia	(81.1%)	(100%)	(100%)	
Ph	6.9 ± 0.2	7.0 ± 0.08 ^a	7.0 ± 0.07 ^b	0.007
pCO ₂ (mmHg)	87.0 ± 22.8	84.7 ± 14.4	71.3 ± 14.6 ^b	0.009
pO ₂ (mmHg)	9.8 ± 4.5	9.8 ± 4.4	14.9 ± 11.2	0.3
Lactato (mg/dL)	10.5 ± 3.6	7.6 ± 1.1 ^a	7.7 ± 1.5 ^b	0.002
Glucosa (mg/dL)	89.5 ± 46.9	96.3 ± 29.8	88.6 ± 41.6	0.8
Na ⁺ (mmol/L)	128.0 ± 4.9	135.6 ± 5.7 ^a	138.9 ± 3.5 ^{b,c}	<0.0001
K ⁺ (mmol/L)	7.2 ± 2.7	5.7 ± 1.7 ^a	4.3 ± 0.7 ^{b,c}	<0.0001
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1 ^{b,c}	<0.0001

^aP<0.05, grupo testigo vs grupo dosis alta; ^bP<0.05, grupo dosis baja vs grupo dosis alta de sildenafil. ^cP<0.05, grupo testigo vs dosis baja

Cuadro 5. Efecto del uso de Sildenafil sobre indicadores de vitalidad en fetos sometidos a asfixia perinatal inducida.

Indicadores	Testigo n=38	Sildenafil Dosis Baja n=16	Sildenafil Dosis Alta n=14	Valor de P A la prueba de ANDEVA
Latencia a primera inspiración (seg)	114.20±14.86 ^a	96.87±12.85 ^a	52.35±6.78 ^b	0.0034
Número de inspiraciones durante la asfixia inducida	16.66±3.52 ^b	14.31±2.82 ^b	28.50±2.91 ^a	0.0058

Nota: 22 de los 30 fetos del grupo testigo presentaron latido cardiaco y apnea permanente.

Cuadro 6. Efecto del uso de Sildenafil sobre los indicadores reproductivos de las cobayas a la cesárea

Indicadores	Testigo	Sildenafil Dosis Baja	Sildenafil Dosis Alta	Valor de P A la prueba de ANDEVA
Peso útero (g)	21.89±1.79 ^a	25.0±1.81 ^a	24.24±1.47 ^a	0.4407
Largo útero (cm)	9.93±1.06 ^b	12.26±0.35 ^{a,b}	13.76±0.33 ^a	0.0257

VII. DISCUSIÓN

Este estudio proporciona evidencia experimental respecto a que las crías de madres tratadas con sildenafil mostraron un incremento en la tasa de sobrevivencia después de un proceso de asfixia perinatal inducida debido a un incremento en el crecimiento fetal y desarrollo orgánico, principalmente de pulmones. El crecimiento retardado de fetos cobayos los hace menos capaces de mantener el oxígeno que es repartido al cerebro y miocardio después de un incremento en el flujo sanguíneo, esto frecuentemente resulta en fetos acidémicos (Detmer *et al.*, 1991). Por lo tanto, parece ser que el peso del feto es un factor decisivo en la sobrevivencia perinatal en cobayos como un reflejo extenso de maduración intrauterina. Las condiciones que reducen la disponibilidad de sustratos o aquellos que reducen el reparto de nutrientes al otro lado de la placenta disminuyen el crecimiento fetal (Clapp *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2001). En contraste, el sobrepeso fetal observado en gestaciones complicadas a causa de diabetes, es resultado de un incremento en la disponibilidad de sustratos que estimulan la secreción de insulina fetal y por ende el crecimiento fetal (Jansson *et al.*, 2006).

En este estudio, el incremento observado en el peso corporal de las madres incluidas en el grupo testigo no fue diferente a lo observado en los dos grupos tratados con sildenafil. Por lo tanto, no es posible atribuir algún otro efecto directo del sildenafil hacia las madres, únicamente el efecto de vasodilatador en las arterias uterinas (Villanueva-García *et al.*, 2007). Aunado a la contribución y suplemento de nutrimentos, el crecimiento fetal también está regulado por la interacción de algunas hormonas. La somatotropina de origen materno y placentario así como los factores de crecimiento maternos como el de insulina, son puntos clave de crecimiento fetal y peso al nacimiento (Evain-Brion *et al.*, 1994; McIntyre *et al.*, 2000; Chellakooty *et al.*, 2004, Trujillo-Ortega *et al.*, 2006). Por lo tanto, los resultados ejercen una implicación dual de porque el sildenafil no solo incremento la habilidad del feto para adquirir más nutrientes debido al incremento en el flujo sanguíneo uterino sino que también, no fue alterada la homeostasis endocrina entre la madre, placenta y feto a consecuencia del

fármaco, favoreciendo así el crecimiento fetal. En los fetos extraídos de madres expuestas a 500 µg/kg de sildenafil, el peso del corazón, pulmones y riñones fue significativamente mayor a diferencia de lo observado en el grupo testigo y grupo tratado con dosis baja, respecto al peso del hígado y cerebro este fue similar, mientras que los bazo fueron más pequeños. Una posible hipótesis es que los fetos extraídos del grupo con dosis alta tuvieron una reducción en el crecimiento del bazo debido a un efecto toxico del sildenafil. Sin embargo, los diferentes parámetros de crecimiento, desarrollo y la mejor tasa de sobrevivencia en las crías expuestas *in utero* a sildenafil en comparación a las crías del grupo testigo no soportan tal hipótesis. En cambio, nuestros resultados son indicativos de que el crecimiento del hígado y cerebro fueron proporcionales al desarrollo muscular en los dos grupos tratados con sildenafil, mientras que el bazo no mostró los mismos resultados. Estas diferencias en la tasa de crecimiento de diferentes órganos respecto al crecimiento general fetal es de suma importancia para investigaciones futuras respecto a su relativa contribución fisiológica sobre la salud fetal.

Los pulmones en cobayos son maduros al nacimiento y más del 50% de fetos cobayos son capaces de sobrevivir desde 8 días previos a su término (Sosenko & Frank, 1987). Diferentes factores medio ambientales incluyendo la nutrición materna pueden alterar de forma adversa el desarrollo intrauterino de pulmones y su función después del nacimiento (Maritz *et al.*, 2005). Los resultados confirman que un crecimiento fetal engrandecido también puede resultar en el incremento de peso en pulmones y en la capacidad de los fetos a tolerar la asfixia intraparto. El corazón también peso mas en los fetos extraídos de madres expuestas a dosis elevadas de sildenafil durante la tercera fase de gestación. El contenido miofibrilar y mitocondrial están desarrollados de forma incompleta en el corazón fetal de cobayos a término (Rolph *et al.*, 1982). Probablemente esto fue porque los fetos con pesos elevados tuvieron corazones más desarrollados, mismos que pudieron haber contribuido al incremento en la tasa de sobrevivencia.

Es conocido que la privación de oxígeno y reducción del flujo de sangre a través del cordón umbilical, estimula al producto para que se lleve a cabo la primera respiración

en animales mamíferos incluyendo al humano (Togari *et al.*, 1992) y cobayos. Los gases en sangre y electrolitos en suero demostraron que los fetos incluidos en el grupo testigo fueron más susceptibles al proceso de acidosis respiratoria con una sobreproducción de ácido láctico así como un desbalance de electrolitos. En contraste, los fetos extraídos de madres expuestas a 50 y 500 µg/kg de sildenafil *in utero* mostraron menor desbalance y estuvo en función de la dosis-dependiente. Tales diferencias pueden ser atribuidas a un mejor desarrollo intrauterino de los fetos extraídos de madres expuestas a sildenafil, existiendo una mayor capacidad de respuesta por respiración a oxígeno y privación de sangre.

Previo a la compresión del cordón umbilical, los niveles de glucosa en sangre fueron elevados en el grupo testigo y con dosis baja de sildenafil a diferencia del grupo tratado con dosis alta de sildenafil. Sin embargo, tales diferencias no fueron sostenidas al final de la asfixia (5 minutos). Estas diferencias pueden ser atribuidas a una mejor compensación de estrés en el grupo de fetos extraídos de madres tratadas con dosis alta de sildenafil. Es bien conocido que la hipoxemia severa desencadena una cascada de eventos iniciando con la glicólisis, glicógenolisis, hipotensión y finalmente la acumulación de elevadas concentraciones de lactato a nivel celular. Por lo tanto, la disminución en los niveles de glucosa del grupo testigo y tratado con dosis baja de sildenafil puede ser secundario a un elevado consumo y depleción del glicógeno hepático almacenado a causa de la hipoxia, el cual puede explicarse por la muerte eventual de casi el 20% de fetos en el grupo testigo. Aunque no se realizaron estudios para conocer si la droga tenía la capacidad de atravesar la barrera placentaria, a pesar de que el sildenafil tiene un peso molecular relativamente bajo de aproximadamente 475 dalton. Por esta razón, no se puede afirmar que el sildenafil atravesó la placenta.

En relación al crecimiento uterino observado en el grupo con dosis alta, Sher y Fisch (2000), mencionan que el sildenafil mejora el crecimiento a nivel de endometrio que a su vez es dependiente del incremento en el flujo sanguíneo de la arteria uterina. Aunado a esto, podemos mencionar que el sildenafil potencializó el efecto vascular del óxido nítrico en el músculo liso (Muirhead *et al.*, 2002) dado inicio a un proceso de

vaso relajación a través del ON-GMPc (Zoma *et al.*, 2004). Esta acción relajante, es a través del efecto de un escaso flujo de la enzima protein kinsa G, resultando en una reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelulares y una disminución de la sensibilidad en los elementos contráctiles como el Ca^{2+} (Khan *et al.*, 2004).

Finalmente, en este estudio, no se observaron ni se identificaron malformaciones morfológicas en los fetos o bien en sus órganos. De la misma manera, ninguno de las evaluaciones preclínicas previas han reportado eventos de teratogenicidad con dosis mucho más altas que las evaluadas en el presente estudio, así como fue mencionado en una revisión sistémica reciente de estudios publicados acerca del sildenafil (Villanueva-García *et al.*, 2007).

De las limitantes del estudio, el relativamente número pequeño de cobayos hembras que solamente tuvieron unos pocos productos limitan un diseño estadístico más apropiado al considerar a las hembras como las unidades experimentales. Sin embargo, las diferencias observadas respecto al crecimiento fetal entre el grupo testigo y los grupos de cobayos tratados con sildenafil fueron muy evidentes y consistentes, particularmente cuando comparamos con el grupo de dosis elevada de sildenafil. Por lo tanto es improbable que esta limitación estadística pueda alterar las conclusiones. Además de esto, no se diseñó alguna evaluación ultra estructural para verificar la carencia de alguna alteración producida por la administración de sildenafil durante la gestación. No se estimaron los niveles de sildenafil en los fetos para evaluar la transferencia de la droga y poder establecer conclusiones más contundentes acerca del mecanismo de acción de este fármaco y su efecto sobre el crecimiento fetal y mucho menos para confirmar la seguridad del uso del fármaco durante la gestación.

VIII. CONCLUSIONES

En conclusión, la administración de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sildenafil a cobayas desde el día 35 hasta el final de la gestación, resulta en un incremento del crecimiento uterino y crecimiento fetal e incrementa la tolerancia a la asfixia perinatal inducida; los fetos extraídos de madres incluidas en los tratamientos con sildenafil 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostraron mejor desarrollo fetal respecto a los fetos del grupo testigo. No se reportó evidencia de malformaciones morfológicas en los fetos extraídos de madres tratadas con sildenafil.

No obstante, es necesario que se realicen estudios a futuro con el objeto de evaluar los posibles efectos adversos en los fetos e incluso en la madre respecto a la administración de sildenafil durante el último tercio de la gestación.

IX. REFERENCIAS

- Aaltonen M, Soukka H, Halkola L, Jalonen J, Holopainen IE, Kero P, Kaapa PO. 2003. Asphyxia aggravates systemic hypotension but not pulmonary hypertension in piglets with meconium aspiration. *Pediatric Research* 53:473-478.
- Adamson SJ, Alessandri L, Badawi N, Burton PR, Pemberton PJ, Stanley F. 1995. Predictors of neonatal encephalopathy in full term infants. *British Medical Journal* 311:598-602. (Citado por da Silva *et al.*, 2000).
- Alward CT, Hook JB, Helmrath TA, Bailie MD. 1978. Effects of asphyxia on renal function in the newborn piglet. *Pediatric Research* 12:225-228.
- Arbay O, Cifti F, Cahit T, Ibrahim K, Nebil B, Akgun H. 1996. In utero defecation by the normal fetus: a radionuclide in the rabbit. *Journal Pediatrics Surgery* 31:1409-1412.
- Ardeschir GH, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT. 2002. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Annals of Internal Medicine* 136:515-522.
- Arikan GM, Scholz HS, Haeusler MCH, Giuliani A, Haas J, Weiss PAM. 2000. Low fetal oxygen saturation at birth and acidosis. *Obstetrics and Gynecology*. 95:565-71.
- Atz, A. M, Wessel, D. L. 1999. Sildenafil ameliorates effects of inhaled nitric oxide withdrawal. *Anesthesiology* 91:307-310.
- Aydin A, Gen K, Akhisaroglu M, Yorukoglu K, Gokmen N y Gonullu E. 2003. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain & Development* 25 (7):494-498.
- Barkovich A. 1992. MR and CT evaluation of profound neonatal and infantile asphyxia. *American Journal of Neuroradiology* 13: 959-972.
- Bernert G, Hoeger H, Mosgoeller W, Stolzlechner D, Lubec B. 2003. Neurodegeneration, neuronal loss, and neurotransmitter changes in the adult cobayo with perinatal asphyxia. *Pediatric Research* 54(4):523-528.

- Bisignano, M., Rees, S. 1988. The effects of intrauterine growth retardation on synaptogenesis and mitochondrial formation in the cerebral and cerebellar cortices of fetal sheep. *International Journal Development Neuroscience* 6:453-460.
- Blennow M, Zeman J, Dahlin I, Lagercrantz H. 1995. Monoamine neurotransmitters and metabolites in the cerebrospinal fluid following perinatal asphyxia. *Biol Neonate*. 67:407-413.
- Bobrow, C. S., Soothill, P. W. 1999. Causes and consequences of fetal acidosis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 80: 246-249.
- Bottiger, B. W., Schmitz, B., Wiessner, C., Vogel, P., Hossman, K. A. 1998. Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18: 1077-1087.
- Bracci R, Perrone S, Buonocore, G. 2001. Red blood cell involvement in fetal/neonatal hypoxia. *Biology of the Neonate* 79:210-212.
- Brouillette RT, Waxman DH. 1997. Evaluation of the newborn's blood gas status. *Clinical Chemistry* 43(1):215-221.
- Buchmann EJ, Pattinson RC, Nyathikazi N. 2002. Intrapartum-related birth asphyxia in South Africa- lessons from the first national perinatal care survey. *South African Medical Journal* 92:897-901.
- Buck LM. 2004. Sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in children. *Pediatric Pharmacotherapy* 10(2):1-5.
- Buhimschi CS, Garfield RE, Weiner CP, Buhimschi IA. 2004. The presence and function of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190:268-274.
- Cameron IT, Campbell FS. 1998. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reproduction Update* 4(5):565-569.
- Challis JR, Fraher L, Oosterhuis J, White SE, Bocking AD. 1989. Fetal and maternal endocrine responses to prolonged reductions in uterine blood flow in pregnant sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 160:926-932.
- Chellakooty M, Vangsgaard K, Larsen T, Scheike T, Falck-Larsen J, Legarth J, Andersson AM, Main KM, Skakkebaek NE, Juul A. 2004. A longitudinal study of intrauterine

- growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89:384-391.
- Chiang CE, Luk HN, Wang TM, Ding PY. 2002. Effects of sildenafil on cardiac repolarization. *Cardiovascular Research* 55(2):290-299.
- Clapp JF, López B, Simonean S. 1999. Nuchal cord and neurodevelopmental performance at 1 year. *J Soc. Gynaecol Invest.* 6:268-272.
- Cruz HM. 1994. *Tratado de Pediatría*. Barcelona: España. 142 pp.
- Cunningham JG. 1997. *Fisiología Veterinaria*. México: McGraw Hill-Interamericana. pp. 662, 697-703.
- Curtis S. 1974. Responses of the piglet to perinatal stressors. *Journal of Animal Science* 38 (5):1031-1036.
- da Silva S, Hennebert N, Denis R, Wayenberg JL. 2000. Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia. *Acta Pediatrica* 89:320-323.
- Demir O, Yazar E, Altunok V, Elmas M, Ozdemir V. 2001. Effect of phenobarbital on antioxidant enzyme activities and blood gas parameters in Balb/C mice. *Revue Med Vet.* 152(10):723-726.
- Deshpande SA, Platt MPW. 1997. Association between blood lactate and acid-base status and mortality in ventilated babies. *Arch Dis Child* 76:F15-F20.
- Detmer A, Gu W, Carter AM. 1991. The blood supply to the heart and brain in the growth retarded guinea pig fetus. *J Devl Physiol* 15:153-160.
- Edwards AD, Azzopardi DV. 2000. Perinatal hypoxia-ischemia and brain injury. *Pediatric Research* 47:431-432.
- Edwards G, Muirhead GJ. 2002. Introduction. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 53:1S-3S.
- El-Khodor BF, Boksa P. 1998. Birth insult increases amphetamine- induced behavioral responses in the adult rat. *Neuroscience* 87:893-904.

- English, P. R., Wilkinson, V. 1982. Management of the sow and litter in late pregnancy and lactation in relation to piglet survival and growth. En: Cole DJA, Foxcroft GR. (eds.). *Control of Pig Reproduction*. London: Butterworths. pp. 479-506.
- Evain-Brion D, Alsat E, Igout A, Frankenne F, Hennen G. 1994. Placental growth hormone variant: assay and clinical aspects. *Acta Paediatrica Suppl*;399:49-52.
- Fernández MP, Villanueva GD, Hernáiz AMI. 2003. Hipertensión arterial pulmonary persistente del recién nacido. En: Villanueva GD, Masud YZJL. (eds). *Neonatología-1, Programa de actualización continua en neonatología. Libro 3. 1ª ed. México DF: Intersistemas, S.A. de C.V. pp. 189-196.*
- Flores SM. 1996. Reanimación del recién nacido. En: *Urgencias en Pediatría*. Rodríguez SR, Velásquez JL, Valencia MP, Nieto ZJ, Serrano SA (eds.). México: Interamericana-Mc Graw Hill. pp. 97-100.
- Fritz KI, Groenendaal F, McGown JE, Mishra OP, Papadopoulos DM. 1996. Effect of cerebral hypoxia on NMDA receptor binding characteristics after treatment with 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP) in newborn piglets. *Brain Research* 729:66-74.
- Gardner SD, Fletcher WJA, Fowden LA, Giussani AD. 2001. A novel method for controlled and reversible long term compression of the umbilical cord in fetal sheep. *Journal of Physiology* 535:217-229.
- Gilbert CL. 1999. Oxytocin secretion and management of parturition in the pig. *Reproduction in Domestic Animal* 34:193-200.
- Gilstrap LC, Leveno JK, Burris J, Williams LM, Little BB. 1989. Diagnosis of birth asphyxia on the basis of fetal pH, Apgar score, and newborn cerebral dysfunction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161(3):825-830.
- Gobry V, Bouchard G, Carrupt PA, Testa B, Girault H. 2000. Physicochemical characterization of sildenafil: ionization, lipophilicity behavior, and ionic-partition diagram studied by two-phase titration and electrochemistry. *Helvetica Chimical Acta* 83:1465-1474.

- Goldenberg RL, Huddleston JF, Nelson KG. 1984. Apgar score and umbilical arterial pH in preterm newborn infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 149: 651-654.
- Greenough A, Lagercrantz H, Pool J, Dahlin I. 1987. Plasma catecholamine levels in preterm infants. *Acta Paediatrica Scandinavica* 76:54-59.
- Guyton CA, Hall EJ. 1997. *Tratado de Fisiología Médica*. México: Mc Graw Hill-Interamericana. pp. 1031
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (4):593-624.
- Hem A, Smith AJ, Solberg P. 1998. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Laboratory Animals* 32:364-368.
- Hernández-González R, Sánchez-Aparicio P, Mota-Rojas D, Arch-Tirado E, Verduzco-Mendoza A, González Lozano M. 2006. El cobayo (*Cavia Porcellus*) y la rata (*Rattus norvegicus*) como modelos experimentales del crecimiento fetal e hipoxia perinatal. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M. (eds). *Perinatología Animal: enfoques clínicos y experimentales*. 1ª ed. México DF: B M Editores, SA de CV: pp. 375-388.
- Herpin P, Hulin JC, Le Dividich J, Fillaut M. 2001. Effect of oxygen inhalation at birth on the reduction of early postnatal mortality in pigs. *Journal of Animal Science* 79:5-10.
- Herpin P, Le Dividich J, Claude HJ, Fillaut M, De Marco F, Bertin R. 1996. Effects of the level of asphyxia during delivery on viability at birth and early postnatal vitality of newborn pigs. *Journal of Animal Science* 74:2067-2075.
- Herpin P, Wosiak F, Le Dividich J, Bertin, R. 1998. Effects of acute asphyxia at birth on subsequent heat production capacity in newborn pigs. *Res Vet Sci* 66:45-49.
- Hill A. 1991. Current concepts of the hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatric Neurosurgery* 7:317-325.
- Hübner ME. 2001. Asfixia perinatal. En: Nacer HJ, Ramírez FR. (eds). *Neonatología*. Hospital Clínico Universidad de Chile. Neonatología, Laboratorio Saval, Chile.

- James LS, Weisbrot IM, Prince CE, Holaday DA, Apgar W. 1958. The acid-base status of human infants in relation to birth asphyxia and the onset of respiration. *Journal of Pediatrics* 52:379-394.
- Jansson T, Cetin I, Powell TL, Desoye G, Radaelli T, Ericsson A, Sibley CP. 2006. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth: a workshop report. *Placenta* 27 Suppl A:S109-S113. Epub 2006 Mar 15.
- Jasso L. 2002. *Neonatología Práctica*. México: Manual Moderno. 363-378 pp.
- Jensen A, Garnier Y, Berger R. 1999. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *European Journal Obstetrics Gynecology and Reproductive Biological* 84:155-172.
- Jensen A, Klonne HJ, Detmer A, Carter AM. 1996. Catecholamine and serotonin concentrations in fetal guinea-pig brain: relation to regional cerebral blood flow and oxygen delivery in the growth-restricted fetus. *Reproduction, Fertility and Development* 8:355-364.
- Jilek L, Travnickova E, Trojan S. 1970. Characteristic metabolic and functional responses to oxygen deficiency in the central nervous system. En: Stave U (eds). *Physiology of the Perinatal Period, Vol 2. Functional and Biochemical Development in Mammals*. New York, Appleton- Century Crofts, Meredith Corp. pp. 987-1041.
- Jones CT, Lafeber HN, Price DA, Parer JT. 1987. Studies on the growth of the fetal cobayo. Effects of reduction in uterine blood flow on the plasma sulphation-promoting activity and on the concentration of insulin-like growth factors-I and -II. *J. Development Physiology* 9:181-201.
- Josten BE, Johnson TRB, Nelson JP. 1987. Umbilical cord blood pH and Apgar scores as an index of neonatal health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 157:843-848.
- Khan RN, Hamoud H, Warren A, Wong LF, Arulkumaran S. 2004. Relaxant action of sildenafil citrate (Viagra) on human myometrium of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191:315-321.

- Kilinc K, Gunduz MI, Gumus BH, Vatansever S, Kaymaz F. 2003. Ultrastructural effect of sildenafil citrate on corpus cavernosum and other genital organs in female rats. *Asian Journal of Andrology* 5(1):37-41.
- Kim SW, Jeong SJ, Munarriz R, Kim NN, Goldstein I, Traish AM. 2004. An in vivo rat model to investigate female vaginal arousal response. *Journal of Urology* 171(3):1357-1361.
- Kleinsasser A, Loeckinger A, Hoermann C, Puehringer F, Mutz N, Bartsch G, Lindner KH. 2001. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:339–343.
- Kohlhauser C, Kaehler S, Mosgoeller W, Singewald N, Prast H, Hoeger H, Lubec B. 1999. Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences* 64:2109-2124.
- Kothari SS, Duggal B. 2002. Chronic oral sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. *Indian Heart J* 54:404-409.
- Lacoius PA. 1987. *Asphyxia*. New York: Plenum Medical. Book Co. pp. 17-59.
- Lafeber HN, Rolph TP, Jones CT. 1984. Studies on the growth of the fetal cobayo. The effects of ligation of the uterine artery on organ growth and development. *Journal Development Physiology* 6:441-459.
- Lagercrantz H. 1994. Excitation of the sympatho-adrenal system at birth. En: Amiel-Tison C, Stewart A (eds). *The Newborn Infant, One Brain for Life*. Paris: Les Editions INSERM. pp. 57-66.
- Larrue B, Jaillard S, Lorthioir M, Roubliova X. 2005. Pulmonary vascular effects of sildenafil on the development of chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *American Journal Physiology Lung Cellular Molecular Physiology* 288:L1193-L1200.
- Lievaart M, de Jong PA. 1984. Acid-base equilibrium in umbilical cord blood and time of cord clamping. *Obstetrics and Gynecology* 63(1):44-47.
- Lossec G, Herpin P, Le Dividich J. 1998. Thermoregulatory responses of the newborn pig during experimentally induced hypothermia and rewarming. *Experimental Physiology*. 83:667-678.

- Low AJ, Pickersgill H, Killen H, Derrick JE. 2001. The prediction and prevention of intrapartum fetal asphyxia in term pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184 (4):724-730.
- Low JA, Lindsay BG, Derrick EJ. 1997. Threshold of metabolic acidosis associated with newborn complications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177: 1391-1394.
- Lubec B, Chiappe-Gutierrez M, Hoeger H, Kitzmueller E, Lubec, G. 2000. Glucose transporters, hexokinase, and phosphofructokinase in brain of rats with perinatal asphyxia. *Pediatric Research* 47:84-88.
- Mallard C, Loeliger M, Copolov D, Rees S. 2000. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 100(2):327-333.
- Maritz GS, Morley CJ, Harding R. 2005. Early developmental origins of impaired lung structure and function. *Early Human and Development* 81:763-771.
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. 2002. *Bioquímica*. España: Addison Wesley. pp. 503-519.
- McIntyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T, Parry A, Johnson S, Leung KC, Ho KK, Bougoussa M, Hennen G, Igout A, Chan FY, Cowley D, Cotterill A, Barnard R. 2000. Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: correlations with fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:1143-1150.
- Menkes 1984. Trauma y asfixia perinatal. En: *Manual del Recién Nacido*. Avery, ME, Taeusch W. (eds). México: Interamericana-McGraw-Hill. pp. 694-695.
- Michelakis E, Tymchak W, Lein D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. 2002. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105:2398-2403.
- Mota RD, Alonso-Spilsbury M, Ramírez-Necoechea R. 2002a. Factores involucrados en la respuesta inmune y en la supervivencia del neonato porcino. *Memorias del 3er*

- Curso de Actualización sobre Inmunología Veterinaria*. UAM-X. Auditorio Vicente Guerrero. 23-25 Enero. pp. 31-33.
- Mota RD, Martínez-Burnes J, Trujillo OME, Alonso-Spilsbury M, Ramírez-Necoechea R, López-Mayagoitia A. 2002b. Oxytocin administration during parturition and effects on umbilical cord and neonatal mortality in pigs. *American Journal of Veterinary Research* 63:1571-1574.
- Mota RD, Ramírez N. 1997a. Lesiones claves para la identificación de la muerte por asfixia en el neonato. *Memorias del VII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Cerdos (ALVEC)*. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. p. 122.
- Mota RD, Ramírez, NR. 1997b. Observaciones clínicas sobre lechones nacidos muertos intraparto. *Memorias del VII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Cerdos (ALVEC)*. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. p. 139.
- Mota-Rojas D, Orozco-Gregorio H, Alonso-Spilsbury M, Villanueva-García D, Martínez Burnes J, López Mayagoitia A, González Lozano M, Trujillo Ortega Ma. Ramírez Necoechea R. 2006. Asfixia perinatal en el bebé y neonato porcino. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M, (eds). *Perinatología Animal: enfoques clínicos y experimentales*. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV: p 293-314.
- Mota-Rojas D, Trujillo OME, Martínez J, Rosales AM, Orozco H, Ramírez R, Sumano H, Alonso-Spilsbury M. 2005a. Comparative routes of oxytocin administration in crated farrowing sows and its effects on fetal and postnatal asphyxia. *Animal Reproduction Science* 92(1-2):123-143.
- Mota-Rojas D. 2005c. *Aplicación de Oxitocina en Diferentes Esquemas de Tratamiento en Cerdas al Parto y su Efecto sobre la Dinámica Uterina, Grado de Asfixia, Mortalidad Fetal y Vitalidad Neonatal*. Tesis Doctoral. Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa/Xochimilco. México D. F. 226 pp.
- Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Trujillo-Ortega ME, Velázquez-Armenta Y, Ramírez-Necoechea R, Martínez-Burnes J, Alonso-Spilsbury M. 2005b. Dose minimization of

- oxytocin in early labor in sows: uterine activity and fetal outcome. *Reproductive Toxicology* 20:255-259.
- Muirhead GJ, Rance JD, Walker KD, Wastall P. 2002. Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil citrate. *British Journal of Clinical Pharmacology* 53:1S-3S.
- Nelson KB, Dambrosia JM, Ting TY, Grether JK. 1996. Uncertain value of electronic fetal monitoring in predicting cerebral palsy. *N Engl J Med* (334):613-618.
- Nodwell A, Carmichael L, Ross M, Richardson B. 2005. Placental compared with umbilical cord blood to assess fetal blood gas and acid-base status. *Obstetrics and Gynecology* 05(1): 129-138.
- Noonan D. 1994. The cobayo cavia porcellus. *Anzcart News* 7(3):1-8.
- Norman JE, Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT. 1999. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Molecular Human Reproduction* 5(2):175-181.
- Norman JE. 1996. Nitric oxide and the myometrium. *Pharmacology* 70:91-100.
- Olmos-Hernández A. 2006. *Caracterización del patron de comportamiento uterino y fetal a traves del monitoreo electronico en cerdas peri-parturientas en dos sistemas de alojamiento, y su efecto sobre la viabilidad y grado de asfixia del neonato*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria México D. F. 172pp.
- Organización Mundial de la Salud. 1998. *The World Health Report, 1998:Life in 21st Century A Vision for All WHO:Geneva*.
- Orozco H, Mota-Rojas D, Hernández-González R, Alonso-Spilsbury M, Nava-Ocampo A, Trujillo ME, Velásquez-Armenta Y, Olmos A, Ramirez-Necoechea R, Villanueva-García D. 2007. Functional consequences of acid-base, electrolyte and glucose imbalance in piglets surviving to intrapartum asphyxia. *Journal of Animal Science* (Enviado).
- Orozco-Gregorio H, Olmos-Hernández A, Mota-Rojas D, Nava Ocampo A, Villanueva-García D. 2006a. Circulación fetal y neonatal: sistema feto-placentario y adaptación

- a la vida extrauterina. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M, (eds). *Perinatología Animal: enfoques clínicos y experimentales*. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV: p 15-26.
- Orozco-Gregorio H, Mota-Rojas D, González-Hernández G. 2006b. Aspectos relevantes del metabolismo energético del feto y noenato. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M, (eds). *Perinatología Animal: enfoques clínicos y experimentales*. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV: p 37-40.
- Phibbs RH. 1994. Bases fisiológicas para la reanimación. En: *Cuidados Intensivos Neonatales*. Sola A, Urman J. (eds). Científica Americana. pp. 16-18.
- Pineda EM, Rodríguez MEA. 2002. *Valor Predictivo del Test Estresante en el Diagnóstico de Circular de Cordón Umbilical en Recién Nacidos de Madres Atendidas en el Instituto Materno Perinatal*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Humana. EPAP de Obstetricia. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Piquard F, Schaefer A, Dellenbach P, Haberey P. 1991. Is fetal acidosis in the human fetus maternogenic during labor? A reanalysis. *American Journal of Physiology* 261:R1294-R1299. (Citado por da Silva *et al.*, 2000).
- Prakash MO, Delivoria PM. 1999. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Research Bulletin* 48(3):233-238.
- Provis VN, Moynihan M. 1999. Neonatal resuscitation in the isolated setting. *Aust J R Health* 7:115-120.
- Quisber VL. 1995. *Neonatología*. México: Interamericana-Mc Graw Hill. Pp.
- Randall GCB. 1971. The relationship of arterial blood pH and pCO₂ to the viability of the newborn piglet. *Can J Comp Med Vet Sci* 35:141-146.
- Randall GCB. 1972. Observations on parturition in the sow. II. Factors influencing stillbirth and perinatal mortality. *Veterinary Record* 90:183-186.
- Randall GCB. 1979. Studies on the effect of acute asphyxia on the fetal pig *in utero*. *Biological of Neonate* 36:63-69.
- Richardson BS, Bocking AD. 1998. Metabolic and circulatory adaptations to chronic hypoxia in the fetus. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 119:717-723.

- Rolph TP, Jones CT, Parry D. 1982. Ultrastructural and enzymatic development of fetal guinea pig heart. *American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology* 243:H87-H93.
- Romijn HH, Hofman MA, Gramsbergen, A. 1991. At what age is developing rat cortex comparable to that of the full term human baby? *Early Human Development* 26:61-67.
- Saling E, Langner K. 1991. Fetal acid-base measurements in labour. En: *Fetal Monitoring. Physiology and Techniques of Antenatal and Intrapartum Assessment*. Spencer JA. (eds). UK: Oxford Univ. Press. pp. 172-177.
- Sánchez-Aparicio P, Villanueva-García D, Mota-Rojas D, Alonso-Spilsbury M, Nava-Ocampo A, Arch-Tirado E, et al. 2006. Efectos sistémicos del citrato de sildenafil en la gestación y periodo perinatal. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M, (eds). *Perinatología Animal: aspectos clínicos y experimentales*. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV, p 59-70.
- Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M. 1992. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *Histochem Cytochem* 40:1439-1456.
- Schwarcz RL; Duverges CA.; Día AG, Fescina RH. 1995. *Obstetricia*. 5ª. Ed. Buenos Aires: Editorial el Ateneo 12: 477-487.
- Shah S, Tracy M, Smyth J. 2004. Postnatal lactate as an early predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. *Journal Perinatology* 24:16-20.
- Shekerdemian LS, Ravn HV, Penny DJ. 2004. Interaction between inhaled nitric oxide and intravenous sildenafil in a porcine model of meconium aspiration syndrome. *Pediatric Research* 55(3):413-418.
- Sher G, Fisch JD. 2000. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Human Reproduction* 15:806-809.

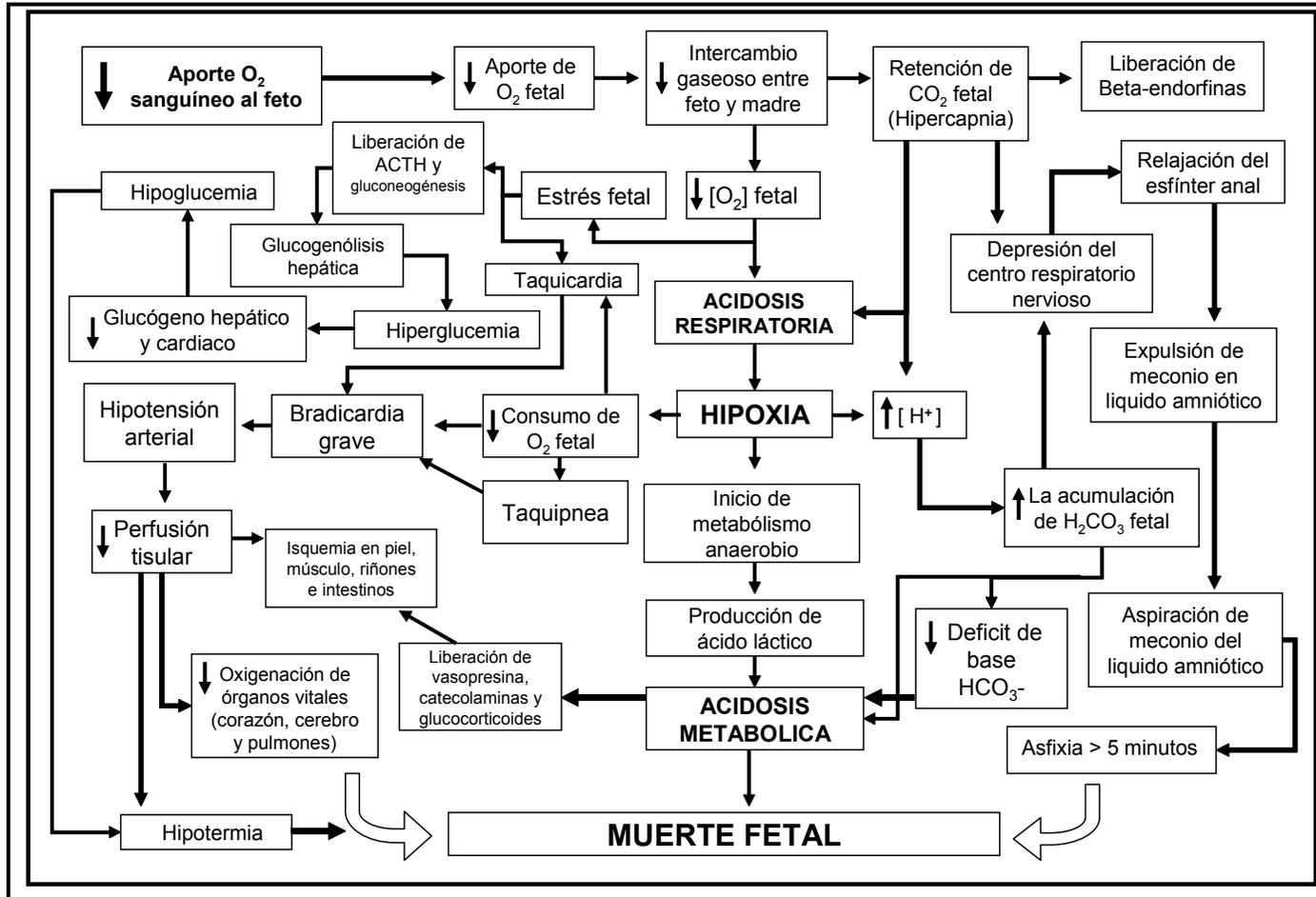
- Sher G, Fisch JD. 2002. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertility and Sterility* 78:1073-1076.
- Singer, D. 1999. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative physiological approach. *Brain Research Bulletin* 48(3):233-238.
- Soothill PW, Nicolaidis KH, Rodeck CH. 1987. Effect of anemia on fetal acid-base status. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 94:880-3.
- Sosenko IR, Frank L. 1987. Lung development in the fetal guinea pig: surfactant, morphology, and premature viability. *Pediatric Research* 21:427-431.
- Sprecher DJ, Leman AD, Dziuk PD, Cropper M, DeDrecker, M. 1974. Causes and control of swine stillbirths. *JAVMA* 165:698-701.
- Stanton HC, Carroll JK. 1974. Potential mechanisms responsible for prenatal and perinatal mortality or low viability of swine. *Journal of Animal Science* 38(5):1037-1044.
- State of the World's Newborns. 2001. *Save the Children*. Washington, DC.
- Steer PJ, Eigbe MF, Lissauer MTJ, Beard RW. 1989. Interrelationships among abnormal cardiotocograms in labor, meconium staining of the amniotic fluid, arterial cord blood pH, and Apgar Scores. *Obstetrics and Gynecology* 74:715-721.
- Strickland DM, Gilstrap LC, Widmer K. 1984. Umbilical cord pH and pCO₂: Effect of interval from delivery to determination. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 13:191-194.
- Sutherland S, Festing M. 1987 Capítulo 6 The guinea-pig. En: Poole, T. (eds) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. Longman Scientific and Technical, Longman Group, London.
- Terril AL, Clemons JD. 1998. Capítulo 5. *The Laboratory Guinea Pig*. CRC Press, pp. 97-101.
- Thompson PL, Aguan K, Pinkas G, Weiner PC. 2000. Chronic hypoxia increases the NO contribution of acetylcholine vasodilation of the fetal cobayo heart. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comp Physiology* 279:R1813-R1820.

- Ting P, Wang P, Song H, Xu S. 1994. Neuro-pathophysio-biochemical profiles of neonatal asphyxia. *Acta Neurochir (Suppl.)* 60:203-206.
- Togari H, Sobajima H, Suzuki S. 1992. Oxygen and reduced umbilical blood flow trigger the first breath of human neonates. *Acta Paediatric Japonica* 34:660-662.
- Tolcos M, Rees S, McGregor H, Walter D. 2002. Consequences of intrauterine growth restriction on ventilatory and thermoregulatory responses to asphyxia and hypercapnia in the newborn guinea-pig. *Reproduction, Fertility and Development* 14:85-92.
- Tollofsrud AE, Solas BA, Saugstad DO. 2001. Newborn piglets with meconium aspiration resuscitated with room air or 100% oxygen. *Pediatric Research* 50(3):423-429.
- Trujillo-Ortega ME, Mota-Rojas D, Hernandez-Gonzalez R, Velazquez-Armenta EY, Nava-Ocampo AA, Ramirez-Necoechea R, *et al.* 2006. Obstetric and neonatal outcomes to recombinant porcine somatotropin administered in the last third of pregnancy to primiparous sows. *Journal of Endocrinology* 189:575-582.
- Tucker JM, Hauth JC. 1990. Intrapartum assessment of fetal well-being. *Clinical Obstetrics Gynecology* 33:515.
- Vaillancourt C, Boksa P. 2000. Birth insult alters dopamine-mediated behavior in a precocial species, the cobayo: implications for schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 23(6):654-666.
- Varley MA. 1995. *The Neonatal Pig. Development and Survival*. U.K.: CAB International.
- Villanueva SO, Hernández GR. 2004. *Manual en Ciencias de los Animales de Laboratorio*. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Villanueva-García D, Mota-Rojas D. 2006. Hipertensión Arterial Pulmonar Persistente del Recién Nacido. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spillsbury M, (eds). *Perinatología Animal: Enfoques Clínicos y Experimentales*. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV: p 71-84.
- Villanueva-García D, Mota-Rojas D, González-Lozano M, Olmos-Hernández AO, Orozco-Gregorio H, Sánchez-Aparicio P. 2006. Importancia de la gasometría sanguínea en

- perinatología y alternativas para restablecer el equilibrio ácido base en el recién nacido con asfixia. En: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-García D, Alonso-Spilsbury M, (eds). Perinatología Animal: Enfoques Clínicos y Experimentales. 1ª ed. México DF: BM Editores, SA de CV: p 183-192.
- Villanueva-García D, Mota-Rojas D, Hernández-González R, Sánchez-Aparicio P, Alonso-Spilsbury M, Trujillo-Ortega ME, Ramírez Necochea R, Nava-Ocampo AA. 2007. A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and preterm labor. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 27:aceptado.
- Vispo SN, Meana J, Karatanasópuloz C, Casal JP, Casal JI. 2002. Sufrimiento fetal agudo. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* 112: 21-25.
- Volpe J. 2001. Hypoxic Ischemic Encephalopathy. Basic aspects and fetal assessment. En: Volpe. *Neurology of the Newborn*. USA: WB Saunders. 4th Ed.
- Waldron GJ, Cole WC. 1994. Activation of vascular smooth muscle K1 channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology* 26:180-184.
- Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. 2005. Sildenafil citrate (Viagra®) enhances vasodilatation in fetal growth restriction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:2550-2555.
- Williams PK, Singh A. 2002. The correlation of seizures in newborn infants with significant acidosis at birth with umbilical artery cord gas values. *Obstetrics and Gynecology* 100(3):557-560.
- Wyatt J. 2002. Applied physiology: brain metabolism following perinatal asphyxia. *Current Pediatrics* 12(3):227-231.
- Yager JY, Thornhill JA. 1997. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neuroscience Biobehaviour Rev* 21:167-174.
- Zaleski HM, Hacker RR. 1993. Effect of oxygen and neostigmine on stillbirth and pig viability. *Journal of Animal Science* 71:298-305.

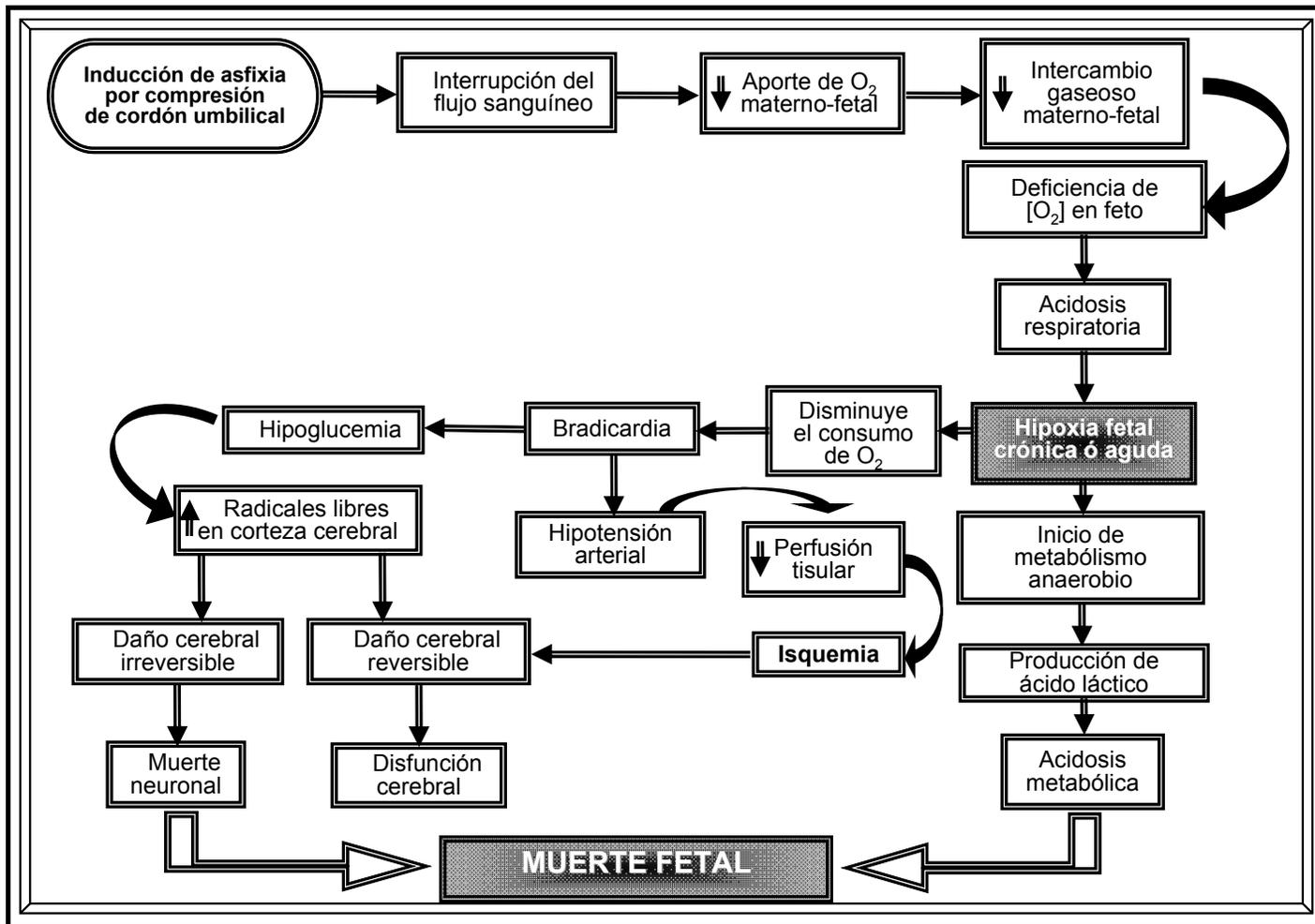
- Zoma WD, Baker RS, Friedman A, Clark KE. 2001. Sildenafil citrate (Viagra) increases uterine blood flow and potentiates estrogen-induced vasodilation (A814). *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 8 (Suppl.):286A
- Zoma WD, Baker RS, Clark KE. 2004. Effects of combined use of sildenafil citrate (Viagra) and 17 β -estradiol on ovine coronary and uterine hemodynamics. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190(5):1291-1297.
- Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT. 2000. Hypoxicischemia related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: A 19 year longitudinal study. *American Journal of Psychiatry* 157:196-202.

X. FIGURAS



Fuente: Mota-Rojas et al., 2006. pág 306.

Figura 1. Fisiopatología de la muerte fetal por asfixia.



Fuente: Hernández-González et al., 2006. pág 381.

Figura 2.- Evolución del proceso de patogénesis de hipoxia-isquemia del feto.

XI. FOTOGRAFÍAS



Foto 1.- Hembras multíparas utilizadas en el desarrollo experimental.



Foto 2.- Cobayos en contenedores formando grupos de 5 animales, alojados dentro de un cuarto en bioterio bajo condiciones de clima controlado.



Foto 3.- Control de humedad del cuarto donde fueron alojados las cobayas bajo estudio.

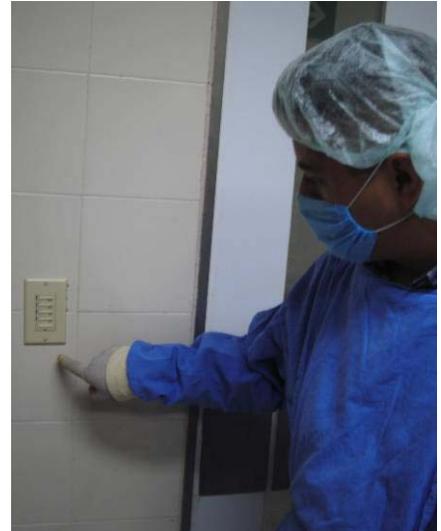


Foto 4.- Control de iluminación para regular ciclos de luz/oscuridad a 4, 8, o 12 horas luz por 20, 16 y 12 horas de oscuridad respectivamente.



Foto 5.- Ilustración del método empleado para el diagnóstico de la gestación en cobayas



Foto 6.- Cada tableta de sildenafil fue extraída de su envoltura comercial para ser macerada a posteriori.



Foto 9.- Aplicación de anestésico por vía intraperitoneal previo a la cesárea.



Foto 7.- Dilución 1:1, una tableta de 50 mg de sildenafil con 50 mL de solución salina a temperatura ambiente.



Foto 10.- Alojamiento temporal de animales anestesiados previo a la cesárea.



Foto 8.- Administración por vía oral de la dilución a cobayas gestantes desde el día 35 de gestación hasta el día de la cesárea.



Foto 11.- Después de la aplicación del anestésico y del proceso de esterilización, se inicio con la cesárea realizando una incisión longitudinal en el área abdominal.



Foto 12.- Extracción gentil de fetos a término a través de la presión ejercida sobre el cuerno uterino.



Foto 15.- Método de asfixia perinatal inducida basada en la compresión del cordón umbilical



Foto 13.- Muestreo sanguíneo por punción cardíaca en fetos a término conectados a placenta.



Foto 16.- Después del sacrificio humanitario de los fetos, se obtuvo el peso individual.

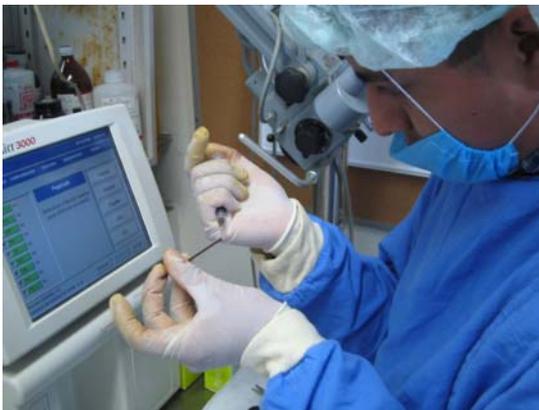


Foto 14.- Transferencia de sangre de una jeringa hacia un micro capilar heparinizado con litio, para ser insertada en un analizador de gases en sangre Gem premier 3000.



Foto 17.- Medición del largo dorsal en fetos a término previamente sacrificados.



Foto 18.- Obtención del ancho de cabeza mediante el uso de un calibrador vernier.



Foto 19.- Medición del ancho de grupa en fetos a término sacrificados a través de un calibrador vernier.



Foto 20.- Extracción simultanea de órganos con la colaboración de los M. en C. Adriana, Miguel ; M.V.Z. Mónica y Antonio.

XII. ANEXOS

1) Artículos aceptados derivados del proyecto de tesis.

J Obstet Gynaecol 2007; 27(4).

1.1) A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and preterm labor

D. Villanueva-García¹, D. Mota-Rojas², R. Hernández-González³, P. Sánchez-Aparicio^{2,4}, M. Alonso-Spilsbury², M.E. Trujillo-Ortega⁵, R. Ramírez Necochea², & A.A. Nava-Ocampo^{6,7}

¹Division of Neonatology, Hospital Infantil de México Federico Gómez, ²Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área: Ecodesarrollo de la Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, ³Department of Experimental Research and Animal Resources, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ⁴Postgraduate Division in Animal Production Sciences and Health, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, ⁵Department of Animal Medicine and Production: Swine, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México, and ⁶Division of Clinical Pharmacology & Toxicology, The Hospital for Sick Children, and ⁷PharmaReasons, Toronto ON, Canada.

Correspondence: Alejandro A. Nava-Ocampo, MD. Division of Clinical Pharmacology & Toxicology, The Hospital for Sick Children, 555 University Ave., Toronto ON, M5G 1X8 Canada. Fax: + (416) 813 7562. E-mail: navaocampo_aa@yahoo.com

Summary

Sildenafil could be an alternative in the treatment of intrauterine growth retardation (IUGR) and premature delivery. In order to systematically review the reproductive-related effects of sildenafil, a search was made on PubMed and the Science Citation Index for studies evaluating the effects of sildenafil on uterine vessels or myometrium either in vitro or in experimental animal models as well as for any clinical trial or case reporting the outcome of pregnant women treated with sildenafil. The information was obtained from 3 in vitro studies, 5 studies performed in experimental animal models, 4 studies on women with fertility and sterility disorders receiving 100 mg/d of sildenafil intravaginally, and 2 case reports of pregnant women who received sildenafil for the

treatment of pulmonary hypertension. Incubation with sildenafil of different in vitro preparations resulted in vasodilator and uterine relaxant effects. No evidence of teratogenicity was observed in the studies performed in mice, rats and dogs. Sildenafil increased fetal weight in rats. In women, contradictory results on uterine blood flow and endometrial development were reported after the intravaginal administration of sildenafil. No adverse fetal outcomes were reported in the two pregnant women with pulmonary hypertension receiving sildenafil late in their pregnancy. In conclusion, there is still limited information about the efficacy of sildenafil for the treatment of IUGR and premature delivery. However, studies in experimental animal models and two human case reports have reported no deleterious effects on the mother or offspring.

Key words: Fetal growth, phosphodiesterase inhibitors, sildenafil citrate, tocolytic agents

Introduction

Sildenafil, the citrate salt of 1-(4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo(4,3-d)pyrimidine-5-yl)phenyl-sulphonyl)-4-methylpiperazine prevents the degradation of the second messenger cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (GMPc) by phosphodiesterase-5 (PDE5) (Ballard *et al.* 1998; Corbin and Francis 1999). It was the first oral treatment used for male erectile dysfunction. Sildenafil was also evaluated for the treatment of female sexual arousal disorder but the results were inconclusive in terms of its efficacy in several large scale, placebo controlled studies involving approximately 3,000 women (Mayor 2004). In addition, at least two experimental studies supported sildenafil as a potential candidate for the treatment of IUGR as well as premature labor in both animals and humans (Buhimschi *et al.* 2004; Belik 2005; Sánchez-Aparicio *et al.*, 2006). Therefore, in order to evaluate whether there is already enough evidence on its efficacy and safety for the treatment of IUGR and premature labor, the aim of this study was to systematically review the reproductive-related effects of sildenafil not related to the treatment of erectile dysfunction and female sexual arousal disorder.

Method

A search was made on PubMed (National Center for Biotechnology Information, United States National Library, Bethesda, MD) and the Science Citation Index Expanded (The Thompson Corporation, Stamford, CT) from its inception on September 30, 2006. Studies evaluating the effects of sildenafil in uterine vessels or myometrium in vitro or in experimental animal models were included. Experimental studies, clinical trials or cases reporting the fetal outcome of pregnant women treated with sildenafil at any time during pregnancy were also included. No limitation in language was used. A review of the titles and, if available, abstracts was performed by 2 of the investigators who eliminated review papers, duplicated manuscripts, and studies evaluating the effects of sildenafil for male erectile dysfunction or women sexual arousal disorders. Nineteen manuscripts were retrieved for further revision. Studies on pulmonary hypertension in pregnant women providing information on the fetal outcome were included. Review papers on sildenafil closely related to the study's interests were also reviewed for identification of useful references. Studies performed to evaluate the efficacy of sildenafil for treating pulmonary hypertension in neonates were excluded from the analysis. Disagreements between investigators were resolved by consensus.

Data abstraction was performed by 2 other investigators. From the in vitro studies the type of tissue, concentrations of sildenafil evaluated, duration of incubation, and main findings were obtained. From the studies performed in experimental animal models the following variables were obtained: animal model and sample size, dose, duration of treatment, and effects. Finally, from the case reports, if available, information regarding the dose, duration of treatment, and effects was obtained. Of the 19 retrieved studies, the information was obtained from 14 selected reports (Sher and Fisch 2000; Agha and Taha 2001; Zoma *et al.* 2001; Paulus *et al.* 2002; Sher and Fisch 2002; Abbott *et al.* 2004; Buhimschi *et al.* 2004; Check *et al.* 2004; Khan *et al.* 2004; Lacassie *et al.* 2004; Belik 2005; Molelekwa *et al.* 2005; Wareing *et al.* 2005; Refuerzo *et al.* 2006).

Results

We identified the following studies reporting the evaluation of sildenafil for reproductive-related purposes: 3 *in vitro* studies, 5 *in vivo* studies in experimental animal models, 4 different reports of non-pregnant women with fertility and sterility problems receiving 100 mg/d of sildenafil intravaginally, and 2 case reports of pregnant women who received sildenafil in combination with other drugs for their treatment of pulmonary hypertension.

The *in vitro* studies showed that incubation with sildenafil resulted in vasodilator and uterine relaxant effects (Table 1). It increased uterine blood flow in ewes and decreased intrauterine pressure in rats at term and preterm labor (Table 2). Two studies in rodents treated with sildenafil showed an increased fetal weight gain. However, its effects were evident only in the group of pups born to mothers exposed to hypoxia. In humans, contradictory results on uterine blood flow and enhanced endometrial development were observed in non-pregnant women after intravaginal administration of sildenafil (Table 3). The larger human study was a retrospective analysis of a cohort of women exposed to sildenafil intravaginally, and reported positive effects of sildenafil for enhancing endometrial development.

In one case report of a pregnant women with pulmonary hypertension treated with 150 mg/d of sildenafil, an increased fetal weight gain was observed, however labor failed to progress after 8 hours of oxytocin infusion (Table 3). The second case report of a pregnant woman treated with sildenafil for pulmonary hypertension did not provide any details on changes in the fetal weight however the baby was born healthy.

In addition, no teratogenic or fetotoxic effects were observed in any of the teratology studies performed in mice, rats and dogs (Table 2). However, the duration of exposure to sildenafil was cited as exposure 'during organogenesis', without specific details. In the two human case reports, one woman received sildenafil for pulmonary hypertension during the first 9 weeks of pregnancy and no teratogenicity was observed (Table 3); both cases received the drug late in pregnancy and no evidence of fetotoxicity was reported.

Discussion

Since its approval by the United States Food and Drug Administration, sildenafil (Viagra) is a drug extensively prescribed for treating men with erectile dysfunction (Jackson *et al.* 2005). However, sildenafil has little or not benefit in the treatment of women with sexual dysfunction (Shields and Hrometz, 2006). On the other hand, this drug has been evaluated for a different range of clinical conditions where a potential role of phosphodiesterases may be relevant (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2006), and its use has currently been extended to treat newborns and adult patients with pulmonary hypertension (Ghofrani *et al.*, 2006; Kane and Klings, 2006). The present systematic review identified that sildenafil may also be considered a potential candidate for treating pregnant women with IUGR or as a tocolytic agent. IUGR affects approximately 8% of all pregnancies (Brar and Rutherford 1988), and is associated with an increased risk of neonatal morbidity and mortality (Yanney and Marlon 2004). Fetal growth is regulated by a complex mechanisms in which hormonal (Gluckman and Pinal 2003; Trujillo-Ortega *et al.* 2006) and vascular changes play a key role throughout pregnancy (Lang *et al.* 2003). Sildenafil may favor fetal weight gain by increasing blood flow within the uteroplacental bed. It may also act as a tocolytic agent. Therefore, sildenafil may be particularly relevant at 24-28 weeks of gestation where extending pregnancy by 7-10 days may significantly influence immediate postnatal and long-term sequels (Hoekstra *et al.* 2004).

Myometrial small arteries from pregnancies complicated by IUGR had increased vasoconstriction and reduced endothelium-dependent relaxation compared with that observed in normal pregnancies (Wareing *et al.* 2005); incubation of small arteries with sildenafil from IUGR pregnancies enhanced endothelium-dependent relaxation to levels seen in the latter. However, as identified in the present systematic review, the uterine vasodilatation effects of sildenafil were not consistently observed across the experimental studies nor were they consistently reported in pregnant women treated with sildenafil for pulmonary hypertension. Sildenafil also showed an increase in fetal weight gain in a study performed in rodents as well as in a pregnant woman with

pulmonary hypertension who received sildenafil at a dose level of 150 mg/d from week 31 to 36 of gestation (Lacassie *et al.* 2004; Belik 2005).

One of the major limitations of the studies on these potentially relevant effects of sildenafil is the reduced number of studies in experimental animal models exploring the hypotheses of whether sildenafil may increase fetal growth gain and whether it has tocolytic effects. In addition, as observed in this systematic review, there is no evidence that sildenafil is teratogenic in experimental animal models even at doses much higher than those prescribed to humans. Furthermore, if evaluated for treating IUGR or premature delivery, sildenafil would be administered in the third trimester of pregnancy, when the risk for gross malformations is over and the delivery of premature, low-birthweight babies is associated with elevated perinatal mortality and morbidity rates. In fact, there is yet no definitive treatment for preterm births and secondary adverse events with current treatments may vary from tolerable maternal tachycardia to fetal death (Hernandez-Hernandez *et al.* 2002; van Veen *et al.* 2005). Therefore, investigations in this area are still very active (Raymajhi and Pratap 2003; Durlach *et al.* 2005; Al-Omari *et al.* 2006).

In conclusion, this systematic review found limited and conflicting experimental and clinical information about the efficacy of sildenafil for the treatment of IUGR and premature delivery. However, no teratogenic or fetotoxic effects of sildenafil have been reported in experimental animal models at dose levels much higher than those used in humans. In addition, the 2 case reports in pregnant women did not show any deleterious effect in the babies exposed late *in utero* to sildenafil.

Acknowledgments

Drs. Mota-Rojas and Alonso-Spilsbury were supported, as members, by the Sistema Nacional de Investigadores. The study was part of the thesis of MSc of Pedro Sánchez-Aparicio, DVM, who is being supported by the scholarship No. 193059 from CONACYT at the Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM. The study was not supported in any form by any pharmaceutical company. The authors are grateful to Ms. Olivia Tischler for editing the manuscript.

References

- Abbott D, Comby P, Charuel C, Graepel P, Hanton G, Leblanc B, et al. 2004. Preclinical safety profile of sildenafil. *International Journal of Impotence Research* 16:498-504.
- Agha AM, Taha RA. 2001. Sildenafil inhibits agonist-evoked rat uterine contractility: influence of guanylyl cyclase inhibition. *European Journal of Pharmacology* 428:343-348.
- Al-Omari WR, Al-Shammaa HB, Al-Tikriti EM, Ahmed KW. 2006. Atosiban and nifedipine in acute tocolysis: a comparative study. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 128:129-34.
- Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, Naylor AM. 1998. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *Journal of Urology* 159:2164-2171.
- Belik J. 2005. Sildenafil administration during pregnancy increases fetal rat weight gain. *FASEB Journal* 19 (Part 2 Suppl.):A1248.
- Brar HS, Rutherford SE. 1988. Classification of intrauterine growth retardation. *Seminars in Perinatology* 12:2-10.
- Buhimschi CS, Garfield RE, Weiner CP, Buhimschi IA. 2004. The presence and function of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190:268-274.
- Check JH, Graziano V, Lee G, Nazari A, Choe JK, Dietterich C. 2004. Neither sildenafil nor vaginal estradiol improves endometrial thickness in women with thin endometria after taking oral estradiol in graduating dosages. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology* 31:99-102.
- Corbin JD, Francis SH. 1999. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *Journal of Biological Chemistry* 274:13729-13732.
- Durlach J, Guet-Bara A, Pages N, Bac P, Bara M. 2005. Magnesium chloride or magnesium sulfate: a genuine question. *Magnesium Research* 18:187-192.
- Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. 2006. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* 5:689-702.
- Gluckman PD, Pinal CS. 2003. Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *Journal of Nutrition* 133:1741S-1746S.
- Hernandez-Hernandez D, Vargas-Rivera M, Nava-Ocampo AA, Palma-Aguirre J, Sumano-Lopez H. 2002. Drug therapy and adverse drug reactions to terbutaline in obstetric patients: a prospective cohort study in hospitalized women. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2:3.
- Hoekstra RE, Ferrara TB, Couser RJ, Payne NR, Connett JE. 2004. Survival and long-term neurodevelopmental outcome of extremely premature infants born at 23-26 weeks' gestational age at a tertiary center. *Pediatrics* 113:e1-e6.
- Jackson G, Gillies H, Osterloh I. 2005. Past, present, and future: a 7-year update of Viagra (sildenafil citrate). *International Journal of Clinical Practice* 59:680-691.

- Khan RN, Hamoud H, Warren A, Wong LF, Arulkumaran S. 2004. Relaxant action of sildenafil citrate (Viagra) on human myometrium of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191:315-321.
- Lacassie HJ, Germain AM, Valdes G, Fernandez MS, Allamand F, Lopez H. 2004. Management of Eisenmenger syndrome in pregnancy with sildenafil and L-arginine. *Obstetrics and Gynecology* 103:1118-1120.
- Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, Clark KE. 2003. Uterine blood flow: a determinant of fetal growth. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 110 Suppl 1:S55-S61.
- Mayor S. 2004. Pfizer will not apply for a licence for sildenafil for women. *British Medical Journal* 328:542.
- Molelekwa V, Akhter P, McKenna P, Bowen M, Walsh K. 2005. Eisenmenger's syndrome in a 27 week pregnancy: management with bosentan and sildenafil. *Irish Medical Journal* 98:87-88.
- Kane LB, Klings ES. 2006. Present and future treatment strategies for pulmonary arterial hypertension: focus on phosphodiesterase-5 inhibitors. *Treatments in Respiratory Medicine* 5:271-282.
- Paulus WE, Strehler E, Zhang M, Jelinkova L, El-Danasouri I, Sterzik K. 2002. Benefits of vaginal sildenafil citrate in assisted reproduction therapy. *Fertility and Sterility* 77:846-847.
- Raymajhi R, Pratap K. 2003. A comparative study between nifedipine and isoxsuprine in the suppression of preterm labour. *Kathmandu University Medical Journal* 1:85-90.
- Refuerzo JS, Sokol RJ, Aranda JV, Hallak M, Hotra JW, Kruger M, et al. 2006. Sildenafil citrate and fetal outcome in pregnant rats. *Fetal Diagnosis and Therapy* 21:259-263.
- Sanchez-Aparicio P, Villanueva-Garcia D, Mota-Rojas D, Alonso-Spilsbury M, Nava-Ocampo A, Arch-Tirado E, et al. 2006. Systemic effects of sildenafil citrate in gestation and perinatal period (*in Spanish*). In: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo A, Villanueva-Garcia D, Alonso-Spilsbury M, editors. *Animal perinatology: clinical and experimental aspects (in Spanish)*. 1st ed. México DF, México: B M Editores, SA de CV; p 59-70.
- Sher G, Fisch JD. 2000. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Human Reproduction* 15:806-809.
- Sher G, Fisch JD. 2002. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertility and Sterility* 78:1073-1076.
- Shields KM, Hrometz SL. 2006. Use of sildenafil for female sexual dysfunction. *Annals of Pharmacotherapy* 40:931-934.
- Trujillo-Ortega ME, Mota-Rojas D, Hernandez-Gonzalez R, Velazquez-Armenta EY, Nava-Ocampo AA, Ramirez-Necochea R, et al. 2006. Obstetric and neonatal outcomes to recombinant porcine somatotropin administered in the last third of pregnancy to primiparous sows. *Journal of Endocrinology* 189:575-582.

- van Veen AJ, Pelinck MJ, van Pampus MG, Erwich JJ. 2005. Severe hypotension and fetal death due to tocolysis with nifedipine. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112:509-510.
- Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. 2005. Sildenafil citrate (Viagra) enhances vasodilatation in fetal growth restriction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:2550-2555.
- Yanney M, Marlow N. 2004. Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 9:411-418.
- Zoma WD, Baker RS, Friedman A, Clark KE. 2001. Sildenafil citrate (Viagra) increases uterine blood flow and potentiates estrogen-induced vasodilation (A814). *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 8 (Supl.):286A

Table 1 *In vitro* reproductive-related effects of sildenafil.

Experimental model	Drug concentration	Duration of treatment	Effects	
Agha & Taha 2001	Full-thickness uterine tissue obtained from each uterine horn from an unspecified number of non-pregnant rats. Each evaluation consisted of 4 experiments.	30 and 100 Nm	Incubation period: 15 min	A shift to the right of the non-cumulative concentration-response curves of PGE ₂ , oxytocin and ACh was observed. Pre-incubation of uterine strips with methylene blue reduced the effects of sildenafil on oxytocin- and ACh-evoked contractions
Khan <i>et al.</i> 2004	Myometrial samples from an unspecified number of women who underwent elective cesarean section at 39-42 weeks gestation. Number of evaluated tissue strips varied from 4 to 12.	10 nmol/L to 1 mmol/L	Cumulative addition of sildenafil every 30 min	Myometrial relaxation probably occurring independently of GMPc but dependently of K ⁺ channels
Wareing <i>et al.</i> 2005	Small arteries obtained at delivery by cesarean section from myometrium biopsies from healthy women with normal FG (n= 12) and women with FGR (n= 27)	0, 10 and 100 nmo/L	Incubation period: 1 hour	A limit of the effects of vasoconstrictors on myometrial small arteries from women with FGR and normal FG

ACh= acetylcholine; FG= fetal growth, FGR: fetal growth restriction; cGMP= cyclic guanosine monophosphate; PGE₂= prostaglandin E₂

Table 2 Reproductive-related effects of sildenafil evaluated *in vivo* in experimental animal models.

	Experimental model	Dose	Duration of treatment	Effects
Zoma <i>et al.</i> 2001	5 non-pregnant ovariectomized ewes	50 mg	One dose	An increase in uterine blood flow
Abott <i>et al.</i> 2004*	Rats	50, 150 and 500 mg/Kg	10 days	No changes in organ weight and histopathology of ovaries and testes
	Dogs	10, 45 and 200 mg/Kg 3, 12 and 60 mg/Kg 10, 30 and 300 mg/kg 5, 20 and 80 mg/Kg 3, 25, and 80 (reduced to 50) mg/Kg	1 month 6 months 10 days 1 month 6 months	<i>Idem</i>
	Rat fertility	3, 10, and 50 mg/Kg 3, 12 and 60 mg/Kg	12 months NE	No treatment-related effects on mating behavior, pregnancy success or other reproductive parameters
	Rat embryo/fetal toxicity	10, 50 and 200 mg/Kg	During organogenesis	Slight or minimal maternal toxicity recorded at maximum dosage. No fetal toxicity recorded.
	Rabbit embryo/fetal toxicity	10, 50 and 200 mg/Kg	During organogenesis	<i>Ibidem</i>
Buhimschi <i>et al.</i> 2004	Two groups of 7 and 6 rats, respectively	Cumulative doses (0.005, 0.05, 0.5, 5 mg/Kg)	In term and preterm labor	Reduction of intrauterine pressure during term and preterm labor beginning at 0.5 mg/Kg
Belik 2005*	Rats	?	By an osmotic pump from day 9 of gestation to one group and orally b.i.d. from day 17 of gestation	An increase in fetal weight gain
Refuerzo <i>et al.</i> 2006	7 non-hypoxic treated rats and 7 controls, as well as 4 hypoxic treated rats and 6 controls	45 mg/Kg q 12 h	On gestational days 18-21 to hypoxic and non-hypoxic rats	A decrease in the size of offspring born to non-hypoxic rats. An increase in the size of pups born to hypoxic animals

*The authors did not clarify the number of animals included in the evaluations.

Table 3 Reproductive-related effects of sildenafil in women.

	Patients	Dose and duration of treatment	Effects
Sher and Fisch 2000	4 patients with prior failed assisted reproductive cycles due to poor endometrial response.	25 mg intravaginally 4 times a day for 7 days	In combination with estradiol valerate, it improved blood flow and endometrial thickness
Sher and Fisch 2002	Retrospective analysis of a cohort of 105 women	25 mg intravaginally 4 times a day for 3-10 days	An enhancement of the endometrial development in 70% of patients occurred
Paulus <i>et al.</i> 2002	10 women with reduced uterine artery blood flow and poor endometrial development	25 mg intravaginally 4 times a day for 9-10 days	No production of vasodilatation effects seen but increased endometrial thickness occurred
Check <i>et al.</i> 2004	Women failing to attain an 8 mm endometrial thickness on either the oocyte retrieval cycle or their first frozen embryo transfer despite an oral graduated E2	25 mg intravaginally 4 times a day	No improvement of endometrial thickness or blood flow in the subsequent frozen embryo transfer-cycle occurred
Lacassie <i>et al.</i> 2004	A 23 year old primigravid with pulmonary hypertension NYHA class varying from II to IV	150 mg/d until the 9 th week of pregnancy. Sildenafil was restarted at week 31 of gestation. She was also treated with diltiazem and L-arginine	An increase in fetal weight gain occurred. At 36 weeks of gestation, a healthy 2.3 kg boy was delivered. However, labor failed to progress after 8 hours of oxytocin infusion and required C-section
Molelekwa <i>et al.</i> 2005	A 23 year old primigravid with pulmonary hypertension NYHA class III	From 28 th to 30 th weeks of gestation at a dose not specified. She was also treated with minihep, progesterone pessaries, continuous oxygen therapy, dexamethasone (1 course), and bosentan	A healthy 1.4 Kg girl was delivered

The studies performed on female sexual arousal disorder were not listed

1.2) Systemic Effects of Sildenafil Citrate on Pregnancy and Perinatal Periods

¹P. Sánchez-Aparicio, ²D. Mota-Rojas, ³D. Villanueva-García, ⁴M.E. Trujillo-Ortega, ⁵R. Hernández-González, ²R. Ramírez Necochea, ²A. Olmos-Hernández and ²M. Alonso-Spilsbury.

¹Postgraduate Division in Animal Production Sciences and Health, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria 04510, México D. F., México. ²Dpto. de Producción Agrícola y Animal. Area: Ecodesarrollo de la Producción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud Coyoacán, México D. F., 04960. México. ³Division of Neonatology, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Vasco de Quiroga 15 Col. Sección XVI Tlalpan, México D.F., 14000. México. ⁴Department of Animal Medicine and Production: Swine, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria 04510, México D. F., México. ⁵Department of Experimental Research and Animal Resources, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Doctor Márquez 162 Col. Doctores Cuauhtémoc México, D. F., 06720. México.

Corresponding author: Dr. Daniel Mota-Rojas, Department of Animal Production and Agriculture, Universidad Autónoma Metropolitana, Plantel Xochimilco, México D. F., México.

Abstract

Sildenafil citrate is an orally administered effective treatment for erectile dysfunction; nevertheless administrated in high concentrations produces relaxation of myometrium in pregnant women, thus sildenafil or related molecules may have future potential tocolytic application. In the present review sildenafil mechanism of action, pharmacokinetics and therapeutic use are discussed. Sildenafil is also considered a potent pulmonary vasodilator in pharmacology representing an alternative to neonates during the last month of in utero development. We conclude that studies in animals including metabolic and physiological traits in the fetus and neonates from treated dams with sildenafil in their last third of pregnancy may help to characterize neonate tolerance to asphyxia with posterior application in human perinatology.

Key words: Sildenafil, phosphodiesterase inhibitors, pregnancy, perinatal.

Introduction

A research program that started in 1985 led to the approval of Sildenafil in 1998, as the first oral treatment for male erectile dysfunction (ED). The initial project objective was the design and synthesis of novel inhibitors of phosphodiesterase (PDE) that would increase tissue levels of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and that could be beneficial for the treatment of cardiovascular conditions. The research programme that led to the discovery of sildenafil originated from the interest in factor atrial natriuretic factor (ANF), an endogenous peptide with vasodilator and natriuretic properties. One of the 2 major synthetic pathways for cGMP generation from guanosine 5'-triphosphate (GTP) is directed by natriuretic peptides, consisting of atrial (ANP), B-type (BNP), and C-type (CNP) natriuretic peptides, which act via the membrane receptor guanylate cyclases GC-A (highest affinity for ANP, BNP) and GC-B (highest affinity for CNP). ANP and BNP, released from the heart by mechanical stretch in response to increased atrial pressure/volume, and CNP, released from the endothelium, can all cause smooth muscle relaxation and vasodilation. ANF exerts its physiological roles by stimulating guanylate cyclase to increase tissue levels of cGMP, although this second messenger will degrade rapidly by a specific phosphodiesterases (Campbell, 2000, Münzel *et al.*, 2003)

The mammalian phosphodiesterases (PDEs) are composed of 11 families of enzymes that catalyze the termination of second messenger activity in cells by breaking the phosphodiester bond of either cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or cGMP. Eleven distinct families have been identified (PDE-1 to PDE-11) that are known or implicated in a broad range of cellular functions. PDE-5 is cGMP-specific and is present in relatively high concentrations in the smooth muscle of corpora cavernosum of the penis. PDE-5 inhibitors enhance erectile function during sexual stimulation by penetrating into smooth muscle cells and inhibiting PDE-5. This results in decreased degradation of cGMP, which maintains sufficient cellular levels of cGMP in both corpus cavernosum and the vessels supplying it. This increases relaxation of the smooth muscle, which dilates the corporeal sinusoids resulting in increased blood flow, allowing an erection to occur. Sildenafil or one of the other PDE-5 inhibitors foster

accumulation of the cell cGMP by competitively inhibiting PDE-5, which triggers penile erection. PDE-5 inhibitors do not increase the nitric oxide level, but they potentiate the nitric oxide effect to stimulate erection. Without sexual arousal, this effect activates the nerve-nitric oxide pathway, these inhibitors are ineffective (Corbin and Francis, 2003). However, with the exception of platelets (a homogenous cell population) the isoforms hydrolyzing cGMP in cells stimulated by NO are uncertain: most studies have been conducted on tissue homogenates in which PDEs normally located in different cell types or cell compartments are mixed together. Knowledge of the participating isoforms is important for understanding the dynamics of the signal transduction pathways and for providing pharmacological tools to probe those pathways (Bellamy and Garthwaite 2001).

Sildenafil citrate (1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine) (Gobry *et al.*, 2000) is an orally administered effective treatment for erectile dysfunction (ED) (Campbell, 2000; Ardeschir *et al.*, 2002; Michelakis *et al.*, 2002; Muirhead *et al.*, 2002), sildenafil has been used with great success in the treatment of male ED, but so far studies in women are scarce (Sher and Fisch, 2000). Moreover, although sildenafil citrate is a well-established drug for treatment of ED, its therapeutic effectiveness in postmenopausal women with diminished sexual response remains to be determined (Zoma *et al.*, 2004).

The citrate of sildenafil not only exerts a relaxant effect directly on the corpus cavernosum, it appears to be such a potent and highly selective inhibitor specific of phosphodiesterase type 5 that augments the vasodilatory effects of nitric oxide (NO) by preventing the degradation of the second messenger cGMP (Gobry *et al.*, 2000; Sher and Fisch, 2000; Ardeschir *et al.*, 2002; Michelakis *et al.*, 2002; Sher, 2002; Khan *et al.*, 2004). Thus, sildenafil citrate promotes smooth muscle relaxation, however the calcium-activated by potassium channels (BKca) have been implicated directly or indirectly in the actions of sildenafil, NO and cGMP (Khan *et al.*, 2004).

In the present review sildenafil mechanism of action and therapeutic use are discussed.

Sildenafil citrate may be recovered from the urine or feces so metabolism is the major mechanism for clearance of sildenafil (Muirhead *et al.*, 2002). Sildenafil metabolites are excreted mainly in the feces (80%), whereas urine rate of excretion is lower (13%). The pharmacokinetics of sildenafil may be influenced by its physicochemical characteristics (Gobry *et al.*, 2000).

Therapeutic applications of sildenafil

Pregnancy: Sildenafil citrate used as a therapeutic agent in women's pregnancies, may improve myometrial perfusion in FGR pregnancies by promoting myometrial small artery vasodilatation, decreasing peripheral resistance and increasing flow within the utero-placental bed (Wareing *et al.*, 2005). Fetal and neonatal asphyxia has been amply studied in human medicine (Lievaart *et al.*, 1984; da Silva *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2001). Mammal neonates have similar physiological mechanisms during asphyxia (Arbay *et al.*, 1996; Singer, 1999), in veterinary medicine the asphyxia process has been studied using as a model the pig (Alward *et al.*, 1978; Randall, 1979; Orozco *et al.*, 2006).

Several alternative potential therapeutic applications of sildenafil have brought new lines of investigation (Khan *et al.*, 2004). For example, successful pregnancies in previously failed attempts of in vitro fertilization have been attributed to the improved vasodilation that is caused by sildenafil citrate (Sher and Fish, 2000). In addition, sildenafil may play a role in the treatment of female sexual dysfunction (Khan *et al.*, 2004). Sildenafil has been used to improve uterine artery blood flow and sonographic endometrial appearance in four patients (women) with prior failed assisted reproductive cycles due to poor endometrial response (Sher and Fisch, 2000). These authors found that vaginal application of Viagra increases endometrial thickness favoring blood flow of the uterine artery in certain women with thin endometrium undergoing in vitro fertilization. They suggest it is necessary to evaluate a random number of patients in order to validate this sort of treatments. With the popularity of Viagra soaring worldwide, it is not surprising that studies are underway to determine the therapeutic efficacy of Viagra in women with diminished sexual response (Zoma *et*

al., 2004). Studies done in women with pregnancy problems and fetal growth restriction, justifies the use of citrate of sildenafil administered in vivo, since it improves the uterine-placenta blood flow (Wareing *et al.*, 2005).

Perinatal asphyxia: Hypoxia in utero or during labor is produced by various causes, including early rupture or compresión of the umbilical cord, which represents an important cause of weak piglets with poor growing rates (Mota *et al.*, 2005). Asphyxia during labor is an important etiology in intra-partum deaths in pigs a high stillbirth rate is associated with anoxia (Mota *et al.*, 2002, 2006ab; Alonso-Spilsbury *et al.*, 2005). Similarly, in human medicine labor complications play an important role causing hypoxia and fetal suffering, which is a complex metabolic perturbation due to a decrease in maternal-fetal exchange, it evolves quickly and leads to a failure in fetal homeostasis with subsequent tisular alterations or fetal death (Schwarcz *et al.*, 1995). After ductus arteriosus compression, changes in the pulmonary circulation cause progressive increase in pulmonary vascular resistance, altering pulmonary vasoreactivity, and inducing vascular and cardiac remodeling, these changes in lung circulation can be prevented by selective PDE-5 inhibition (Larrue *et al.*, 2005). The compression of the ductus arteriosus and the prevention of pre-term labor remains one of the primary goals of obstetric research. Nevertheless, neonatal death most important cause is premature babies prematurity (Norman *et al.*, 1999).

Cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury

Sildenafil inhibits PDE V, the enzyme that specifically hydrolyzes cGMP. By a complex mechanism, increased intracellular cGMP leads to the hyperpolarization of smooth-muscle membranes and subsequent vascular relaxation. Moreover, cGMP is involved in the regulation of myocardial L-type Ca^{2+} channel current (ICa): In guinea pig, frog, and human cardiomyocytes, cGMP can also stimulate ICa via inhibition of cGMP-inhibited cyclic adenosine monophosphate (cAMP) PDE (PDE III), thus augmenting cardiac output. PDE isozyme types I, III, IV, and V are present in the human pulmonary artery. Sildenafil inhibits PDE V, the enzyme that specifically hydrolyzes cGMP. By a complex

mechanism, increased intracellular cGMP leads to the hyperpolarization of smooth-muscle membranes and subsequent vascular relaxation. Moreover, cGMP is involved in the regulation of myocardial L-type Ca²⁺ channel current (ICa): In guinea pig, frog, and human cardiomyocytes, cGMP can also stimulate ICa via inhibition of cGMP-inhibited cyclic adenosine monophosphate (cAMP) PDE (PDE III), thus augmenting cardiac output. PDE isozyme types I, III, IV, and V are present in the human pulmonary artery (Kleinsasser *et al*, 2001).

Each year, more than 25,000 children undergo corrective surgery for congenital heart disease. Early surgical intervention is important to promote more normal development. Infants undergoing surgery for congenital heart disease are at risk for myocardial ischemia during cardiopulmonary bypass, circulatory arrest, or low-flow states. Brief episodes of ischemia protect the myocardium from more prolonged periods of ischemia, a phenomenon called ischemic preconditioning. A variety of other stimuli, such as hypoxia, thermal stress, pharmacologic agents, and endogenous triggers of preconditioning such as nitric oxide and adenosine have also been shown to induce cardioprotective effects in several animal species. Also, recent studies from Ockaili *et al.* (2002), have shown that sildenafil citrate, a selective PDE-5 inhibitor, induces powerful preconditioning-like protective effects in the ischemic heart. Sildenafil induced delayed cardioprotective effect in the mouse heart through up-regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Salloum *et al*, 2003). The hypothesis behind these studies was that the vasodilatory action of sildenafil could potentially release endogenous mediators of preconditioning such as adenosine, bradykinin, or nitric oxide. One or more of these mediators may trigger a signaling cascade leading to activation of protein kinase C and opening of the mitoKATP channel resulting in acute and delayed cardioprotective effects. It is possible that sildenafil citrate may be clinically important in protection of the heart in the setting of cardiac surgery using cardiopulmonary bypass, circulatory arrest, or low-flow states in infants with congenital heart disease. (Das *et al.*, 2004)

Persistent pulmonary hypertension of the newborn

The fetal growth restriction is responsible for considerable perinatal mortality and morbidity; infants have increased risk of perinatal complications such as fetal distress, asphyxia, neonatal encephalopathy, hypothermia, hypoglycaemia and poor feeding, as well as risks of long term neurological and developmental disorders (Wareing *et al.*, 2005). The persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) contributes to increase dramatically neonatal morbidity and mortality. It is a clinical syndrome that is associated with diverse neonatal cardiopulmonary diseases, including birth asphyxia, sepsis, meconium aspiration and respiratory distress syndrome it can be idiopathic too (Larrue *et al.*, 2005).

Sildenafil may significantly increase plasma cGMP levels. This increase in cGMP raises the possibility of modulation of cGMP-regulated phosphodiesterases in tissues in which phosphodiesterase 5 is not present (eg, the myocardium), (Schalcher *et al.*, 2002). In lung tissue it is a rich source of phosphodiesterases, phosphodiesterase-3 (PDE3) and phosphodiesterase-4 (PDE4) (Ardeschir *et al.*, 2002).

Mortality

In the United States, sildenafil has already been prescribed more than 6 million times (representing 50 million tablets), and 130 deaths of patients who had been prescribed sildenafil were reported to the U.S. Food and Drug Administration by November 1998.

In summary, due to sildenafil citrate's important use as a potent vasodilator in pharmacology, and its different uses in research, we consider that it may represent a viable alternative in models of neonate animals from mothers treated in the last third of pregnancy. Ongoing research evaluating physiological and metabolic traits in animal neonates may help to characterize neonate tolerance to asphyxia with posterior application in human perinatology.

Acknowledgments

The study was supported by Cuerpo Académico de Etología, Producción Porcina y Fauna Silvestre, UAM-X. Drs. Mota-Rojas, Trujillo-Ortega, Hernández-González and

Alonso-Spilsbury were supported, as members, by the Sistema Nacional de Investigadores. This study was part of the thesis of MSc of Pedro Sánchez-Aparicio, DVM, who is being supported by grant No. 193059 from CONACYT at the Maestria en Ciencias de la Produccion y de la Salud Animal, UNAM. The study was not supported in any form by any pharmaceutical company.

References

- Alonso-Spilsbury, M.; Mota-Rojas, D.; Villanueva-García, D.; Martínez-Burnes, J.; Orozco, G.H.; Ramírez-Necoechea, R.; López, A. & Trujillo-Ortega, M.E., 2005. Perinatal asphyxia pathophysiology in foetal and human neonate: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 1-30.
- Alward, T.C., B.J. Hook, A.T. Helmrath, D.M. Bailie, 1978. Effects of asphyxia on renal function in the newborn piglet. *Ped. Res.*, 12: 225-228.
- Arbay, O., F. Cifti, T. Cahit, K. Ibrahim, B. Nebil, H. Akgun, 1996. In utero defecation by the normal fetus: a radionuclide in the rabbit. *J. Ped. Su.*, 31: 1409-1412.
- Ardeschir, G.H., R. Wiedemann, F. Rose, H. Olschewski, R.T. Schermuly, 2002. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann. Intern. Med.*, 136: 515-522.
- Bellamy, T.C., J. Garthwaite, 2001. "cAMP-Specific" Phosphodiesterase Contributes to cGMP Degradation in Cerebellar Cells Exposed to Nitric Oxide. *Mol. Prarmacol.*, 59 (1): 54-61.
- Campbell, F.S., 2000. Science, art and drug discovery: a personal perspective. *Clinical. Sci.*, 99: 255-260.
- Corbin, J.D. and Francis SH., 2003. Molecular Biology and Pharmacology of PDE-5—Inhibitor therapy for erectile dysfunction. *J. Androl.*, 24(6): S38-41.
- da Silva, S., N. Hennebert, R. Denis, L. Wayenberg, 2000. Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia. *Acta Paediatr.*, 89: 320-323.
- Das, A., R. Ockaili, F. Salloum, R.C. Kukreja, 2004. Protein kinase C plays an essential role in sildenafil-induced cardioprotection in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 286: H1455–H1460
- FDA, 1998. Food and Drug Administration. U.S. Postmarketing safety of sildenafil citrate. Summary of reports of deaths in sildenafil citrate users from late March through mid-November 1998. Washington DC: U.S. Food and Drug Administration (Center for Drug Evaluation and Research).
- Gobry, V., G. Bouchard, P.A. Carrupt, B. Testa, H. Girault, 2000. Physicochemical characterization of sildenafil: ionization, lipophilicity behavior, and ionic-partition diagram studied by two-phase titration and electrochemistry. *Helv. Chim. Acta.*, 83(7):1465-1474.
- Kleinsasser, A., A. Loeckinger, C. Hoermann, F. Puehringer, N. Mutz, G. Bartsch, K.H. Lindner, 2001. Sildenafil Modulates Hemodynamics and Pulmonary Gas Exchange. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163 (2):339-343.

- Khan, R.N., H. Hamound, A. Warren, L.F Wong, S. Arulkumaran, 2004. Relaxant action of sildenafil citrate (viagra) on human myometrium of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 191: 315-321.
- Larrue, B., S. Jaillard, M. Lorthioir, X. Roublieva, 2005. Pulmonary vascular effects of sildenafil on the development of chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 288: L1193-L1200.
- Lievaart, M., P.A. de Jong, 1984. Acid-base equilibrium in umbilical cord blood and time of cord clamping. *Obst. Gynecol.*, 63(1): 44-47.
- Low, A.J., H. Pickersgill, H. Killen, J.E. Derrick, 2001. The prediction and prevention of intrapartum fetal asphyxia in term pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 184(4):724-730.
- Michelakis, E., W. Tymchak, D. Lein, L. Webster, K. Hashimoto, S. Archer, 2002. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation.*, 105:2398-2403.
- Mota-Rojas, D., J. Martínez-Burnes, M. E., Trujillo-Ortega, M. L. Alonso-Spilsbury, R. Ramírez-Necochea, and A. Lopez, 2002. Effect of oxytocin treatment in sows on umbilical cord morphology, meconium staining, and neonatal mortality of piglets. *Am. J. Vet. Res.*, 63:1571-1574.
- Mota-Rojas, D., A. Nava-Ocampo, M.E. Trujillo-Ortega, Y. Velázquez-Armenta, R. Ramírez-Necochea, J. Martínez-Burnes, M. Alonso-Spilsbury, 2005. Dose minimization of oxytocin in early labor in sows: uterine activity and fetal outcome. *Reprod. Toxicol.*, 20: 255-259.
- Mota-Rojas, D.; Martínez-Burnes, J.; Alonso-Spilsbury, M.; López, A.; Ramírez-Necochea, R.; Trujillo-Ortega, M.E.; Medina-Hernández, F.J.; de la Cruz, N.I.; Albores-Torres, V. and Loredó-Osti, J. 2006a. Meconium staining of the skin and meconium aspiration in porcine intrapartum stillbirths. *Livestock. Science.* 102: 155-162.
- Mota-Rojas, D., D. Villanueva-García, E. Y. Velázquez-Armenta, A. A. Nava-Ocampo, R. Ramírez-Necochea, M. Alonso-Spilsbury, and M. E. Trujillo, 2006b. Influence of time at which oxytocin is administered during labor on uterine activity and perinatal death in pigs. *Biol. Res.* 39: in press.
- Muirhead, G.J., J.D. Rance, K.D. Walker, P. Wastall, 2002. Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil citrate. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53:1S-3S.
- Münzel, T., Robert Feil R, Mülsch A, Suzanne M, Lohmann SM, Franz Hofmann F, MD; Ulrich Walter U, 2003. Physiology and Pathophysiology of Vascular Signaling Controlled by Cyclic Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Circulation.*, 108:2172.
- Norman, J.E., A.J. Thomson, J.F. Telfer, A. Young, I.A. Greer, I.T. Cameron, 1999. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Mol. Human Reprod.*, 5(2):175-181.
- Ockaili, R., F. Salloum, J. Hawkins, R.C. Kukreja, 2002. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial KATP channel in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283:1263-1269.

- Orozco, H., D. Mota-Rojas, R. Hernández-Gonzalez, M. Alonso-Spilsbury, A.A. Nava-Ocampo, M. Trujillo-Ortega, Y. Velázquez-Armenta, A. Olmos-Hernández, R. Ramírez-Necoechea, D. Villanueva-García, 2006. Functional consequences of acid-base, electrolyte and glucose imbalance in piglets surviving to intrapartum asphyxia. *Reprod. Toxicol.*, (submitted).
- Randall, G.C.B., 1979. Studies on the effect of acute asphyxia on the fetal pig in utero. *Biol. Neonate*, 36:63-69.
- Salloum, F., C. Yin, L. Xi, R.C. Kukreja, 2003. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circ. Res.*, 92: 595-597.
- Schwarcz, R.L., C.A. Duverges, A.G. D'Á, R.H. Fescina, 1995. *Obstetricia*. 5ta. Ed. Buenos Aires: El Ateneo. Cap. 12:477-487.
- Schalcher, C.H., K. Schad, H.P. Brunner-La Rocca, R. Schindler, E. Oechslin, C.H. Scharf, G. Suetsch, O. Bertel, W. Kiowski, 2002. Interaction of Sildenafil With cAMP-Mediated Vasodilation In Vivo. *Hipertensión.*, 40(5):763-7.
- Sher, G., J.D. Fisch, 2000. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Human Reprod.*, 15(4): 806-809.
- Sher, G., 2002. Sildenafil enhances endometrial development. *Fertility Weekly.*, Nov 25 & Dec 2: 10-11.
- Singer, D., 1999. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative physiological approach. *Brain Res. Bull.*, 48(3): 233-238.
- Wareing, M., J. Emyers, M. O'Hara, P.N. Baker, 2005. Sildenafil citrate (Viagra®) enhances vasodilation fetal growth restriction. *J. Clin. Endocrinol Metabolism.*, 15:1-20.
- Zoma, W.D., R.S. Baker, K.E. Clark, 2004. Effects of combined use of sildenafil citrate (Viagra) and 17 β -estradiol on ovine coronary and uterine hemodynamics. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 190(5):1291-1297.

2) Cartas de aceptación de Artículos aceptados

a): "A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and preterm labor"

Journal of
**Obstetrics and
Gynaecology**

Editors Mr H Gordon & Professor AB MacLear

Department of Obstetrics and Gynaecology
Third Floor, Ham House
Hammersmith Hospital
Du Cane Road
London W12 0NN
Telephone +44 (0)20 8383 3920
Fax +44 (0)20 8383 2342

27th November 2006

Dr AIA. Nava-Ocampo,
Division of Clinical Pharmacology & Toxicology,
The Hospital for Sick Children,
555, University Avenue,
Toronto On M5G 1X8
CANADA

Re: MS 6055: Sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and preterm labour

Dear Dr Nava-Ocampo,

This paper has been accepted for publication subject to verbal and other amendments that may be made by the Editor.

It should appear in the ---May 2007---issue. Volume 27, number 4.

Please note, on acceptance copyright for your article will pass to the publishers. If you have not already done so, please supply a floppy disk or CD of the final version and your e-mail address.

Yours sincerely



ZW Zara Whitlock
Editorial Assistant

b): “Systemic Effects of Sildenafil Citrate on Pregnancy and Perinatal Periods”

3) Formato para registrar indicadores y variables durante y después de la cesárea en cobayos.

Cesárea, morfometría y pesaje de órganos de fetos										Fecha _____		
Variables Hembra								Grupo: 1 2 3				
N° cobaya				Placenta								
# Parto				Hora	:							
Peso				Peso								
Variables al parto												
Cobaya / feto	Cobaya ()		Feto 1		Feto2		Feto 3		Feto 4			
Hora cesárea/extracción feto	:		:		:		:		:			
Estado extraído vivo/muerto	CEV	CEM	CEV	CEM	CEV	CEM	CEV	CEM	CEV	CEM		
Sexo	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
Viabilidad Neonatal												
FC	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Latencia Intentos Inspiración (seg)												
Número de Intentos de Inspiración												
Mediciones Zoométricas del cobayo escala (cm)												
Largo dorsal												
Perímetro abdominal												
Perímetro torácico												
Ancho de grupa												
Ancho de cabeza												
Perímetro cañas												
Órganos escala (mg)												
L=largo, A=ancho	Peso	L/A	Peso	L/A	Peso	L/A	Peso	L/A	Peso	L/A		
Corazón		/		/		/		/		/		
Pulmones		/		/		/		/		/		
Hígado		/		/		/		/		/		
Bazo		/		/		/		/		/		
Riñones Derecho		/		/		/		/		/		
Riñones Izquierdo		/		/		/		/		/		
Adrenales		/		/		/		/		/		
Encéfalo		/		/		/		/		/		
Útero (madre) / Placenta (feto)		/		/		/		/		/		