

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I  
GINECOLOGIA

EFFECTO DEL SILDENAFILO SOBRE UN MODELO DE  
PREECLAMPSIA ANIMAL.

SONIA HERRAIZ RAYA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 de desembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Vicente Serra Serra
- Dr. Joaquín Díaz Recasens
- Dr. Juan Luis Alcázar Zambrano
- Dr. Bienvenido Puerto Navarro
- Dr. Alfredo Perales Marín

Va ser dirigida per:

Dra. Begoña Pellicer Iborra

Dr. Vicente Felipo Orts

Dr. Antonio Pellicer Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions  
Sonia Herraiz Raya

---

Dipòsit legal: V-4104-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-8088-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

# VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y Odontología.**

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**



## **EFFECTO DEL SILDENAFILO SOBRE UN MODELO DE PREECLAMPSIA ANIMAL.**

**Tesis doctoral presentada por:**

Sonia Herraiz Raya.

Valencia, 2010.



Dña. Begoña Pellicer Iborra, Jefa del Servicio de Ginecología y Obstetricia del hospital de Manises. Doctora en Medicina y Cirugía.

D. Vicente Felipo Orts, Investigador Jefe y Director del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Doctor en Ciencias Químicas.

D. Antonio Pellicer Martinez, Catedrático en Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado EFECTO DEL SILDENAFILO SOBRE UN MODELO DE PREECLAMPSIA ANIMAL ha sido realizado íntegramente por Dña. Sonia Herraiz Raya, licenciada en Biología, bajo su dirección. Dicha memoria está concluida y reúne los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste firman la presente certificación en Valencia a 26 de Septiembre de 2010.

Fdo. Begoña Pellicer

Fdo. Vicente Felipo

Fdo. Antonio Pellicer

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría aprovechar estas líneas para mostrar mi más sincero agradecimiento a todos los que me han acompañado en este viaje.

Al Dr. Antonio Pellicer, mi director, por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis a su lado y apoyar el proyecto desde el principio.

A la Dra. Begoña Pellicer, por ser mi directora, mi guía y sobretodo mi compañera durante estos cuatro años, sin tu energía esto no hubiera sido posible. Gracias por creer en mi.

Al Dr. Vicente Felipe darle las gracias por su colaboración y su inestimable ayuda, también por hacerme un sitio en su equipo. A los Drs. Esteban Morcillo y Julio Cortijo, gracias por su colaboración en el proyecto.

Al Dr. Carlos Simón por acogerme en su laboratorio y prestarme todas sus instalaciones.

A todos los compañeros del Banco: M<sup>a</sup> Eugenia, Diana, Evita, Cristóbal, Marcia, José Vicente, Anabel, Ana y Manuel... gracias por vuestro apoyo y vuestra compañía, a Aymara, Claudia, Laura, Amparo F, Irene, Eva, Esther, Amparo G y Vero por los buenos ratos y los malos cafés. También a los que ya no estáis, gracias.

A los miembros de la Fundación IVI gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al servicio de Anatomía patológica del Hospital Clínico de Valencia por su ayuda con el procesamiento de muestras, en especial al Dr. Miguel Cerdá por su interés y su tiempo; a sus técnicos M<sup>a</sup>José y Bruno por todas las tardes divertidas entre bloques de parafina.

Al laboratorio de Fisiología de la Facultad de Farmacia por sus conocimientos e instalaciones para la cromatografía, en especial al Dr. Miguel Asensi, por su tiempo y su buen humor.

Un beso a las chicas del laboratorio de Neurobiología de CIPF: Mar, Paqui, M<sup>o</sup> Carmen, Isa, Regina y a Omar.

A los que me acompañaron al principio: Celia, Alberto, Javi, en especial a Eva y Mariola,... y a los que llegaron después como M<sup>o</sup> Carmen. A los de en medio también gracias aunque no os nombre a todos.

A mis amigas de toda la vida, Belén y Sandra y sobretodo a Lidia y Teresa, por ayudarme y darme aire.

A toda mi familia, a mis primas y primos, en especial a Paula.

A mi madre, si ti no seria nada, gracias por tu fuerza y tu tesón. A papá, aunque no estés, siempre te llevó conmigo.

A mi hermana Lauri, mi persona preferida, por las noches en vela y por estar a mi lado siempre, en los días buenos y sobretodo en los malos. Estar contigo hace que mi vida sea mejor.

A Julio, mi amor, mi amigo y mi compañero siempre, por enseñarme una forma diferente de ver las cosas, por quererme tanto y tan bien, por aguantar mis neuras y por estos doce años maravillosos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

Ang II: angiotensina II

CD62P: P-selectina.

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe.

CRL: longitud corona-rabadilla, del inglés *crown-rump lenght*.

D: diámetro.

DM-SC: desmetilsildenafil.

DV: Ductus venoso.

E0-E22: día de desarrollo embrionario, del inglés *embryonic day*.

ED: pico diastólico.

EN: encefalopatía neonatal.

ENOS: oxido nítrico sintasa endotelial

ET-1: endotelina 1.

EVCT: citotrofoblasto extraveloso.

FC: frecuencia cardiaca

GMPc: Guanosin monofosfato cíclico.

HIE: encefalopatías hipóxico-isquémicas.

HIF: factor inductor de hipoxia.

INOS: oxido nítrico sintasa inducible.

IP: pulsatilidad.

IP: via intraperitoneal.

IPV: índice de pulsatilidad venoso.

IR: índice resistencia.

LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas.

L-NAME: L-nitro arginina metil ester.



MHz: Megahercios.

NNOS: oxido nítrico sintasa neuronal.

NOS: oxido nítrico sintasa

O<sub>2</sub>: oxígeno.

ON: oxido nítrico.

OVF: onda de velocidad de flujo.

PDE: fosfodiesterasa.

PDE-5: fosfodiesterasa tipo 5.

PFA: paraformaldehido.

PGI<sub>2</sub>: prostaglandina.

PND1 : día postnatal 1

PE: preeclampsia.

PS: pico sistólico.

RCIU: restricción del crecimiento intrauterino.

SC: Sildenafil

sFlt-1: forma soluble de la tirosin quinasa-1.

SNC: sistema nervioso central.

TAM: tensión arterial materna.

TAS: tensión arterial sistólica.

TGFβ<sub>3</sub>: factor de transformación del crecimiento (*transforming growth factor*)”

TXA<sub>2</sub>: tromboxano 2.

UDPGT: uridin difosfato glucuroniltransferasa.

VF: volumen de flujo del vaso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1. La Preeclampsia.....	2
2. Placentación. Etapas .....	6
2.1.La primera invasión vascular por el citotrofoblasto.....	6
2.2. Segunda invasión vascular por el citotrofoblasto .....	8
3. Factores vasomotores: papel del óxido nítrico (ON) en la placentación .....	9
4. El modelo animal como aproximación al conocimiento de la fisiopatología de la PE. ....	11
5. PE y posibles dianas de actuación. Inhibidores de la Fosfodiesterasa 5.....	12
6. Efectos de la PE sobre el desarrollo neurológico fetal. Daño cerebral.....	15
II.-HIPÓTESIS.....	21
III.- OBJETIVOS .....	23
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
Elección del modelo animal .....	26
1.- Desarrollo del modelo. ....	26
2.- Medida de la tensión arterial (TA) .....	29
3.-Control de la proteinuria y bienestar animal.....	30
4.- Cromatografía líquida-Espectrometría de masas(LC-MS).....	30
5.- Sacrificio y toma de muestras.....	32
6.- Estudio plaquetario de la sangre materna mediante citometría de flujo .....	33
7.- Estudio de la supervivencia y la evolución de la descendencia .....	36
8.- Valoración de los parámetros hemodinámico de las arterias uterinas de la rata mediante Doppler pulsado.....	36
9.- Valoración de los parámetros hemodinámicos del Ductus venoso fetal .....	37

10.- Evaluación del efecto de los tratamientos en el desarrollo neurológico de la descendencia .....	38
10.1 Test de aprendizaje de discriminación condicional en el laberinto Y.....	38
10.2 Test de coordinación motora ROTAROD.....	40
10.3 Test de comportamiento locomotor espontáneo .....	40
 V.- RESULTADOS .....	 41
1. - Detección y cuantificación de la molécula de sildenafilo en plasma e hígado materno y en hígado fetal a lo largo de la gestación.....	42
1.1.- Cuantificación de SC y DM-SC en plasma materno a lo largo de la gestación.....	42
1.2.- Cuantificación de SC y DM-SC en hígado materno y fetal.....	43
 2.- Efectos sobre la tensión arterial y la hemodinámica maternas durante la gestación en los 4 grupos.....	 44
2.1 Tensión arterial materna y proteinuria.....	44
2.2 Crecimiento intrauterino y postnatal.....	46
2.3 Morbimortalidad perinatal .....	48
2.4 Crecimiento placentario .....	49
2.5 Serie celular hematopoyética materna y peso del hígado fetal.....	49
2.6 Parámetros hemodinámicos materno-fetales valorados con tecnología Doppler.....	50
2.6.1 Hemodinámica de las arterias uterinas maternas.....	50
2.6.2 Hemodinámica del Ductus venoso fetal .....	53
3.- SNC Post-natal. Desarrollo neurológico de la descendencia.....	54
3.1. Test de aprendizaje de discriminación condicional en el laberinto en Y.....	54
3.2 Test de coordinación motora ROTAROD .....	55
3.3 Test de comportamiento locomotor espontáneo.....	56
 VI.- DISCUSIÓN .....	 57

VII.- CONCLUSIONES .....	71
VIII.- BIBLIOGRAFÍA .....	73
ANEXO .....	87



# **I.- INTRODUCCIÓN**

## I.- INTRODUCCIÓN.

### 1.- Preeclampsia.

La Preeclampsia (PE), es la principal causa de muerte materna en el mundo. Se considera uno de los problemas obstétricos más relevantes y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad perinatal. Afecta al 7-10% de todos los embarazos y en Estados Unidos representa al menos el 15% de las muertes relacionadas con la gestación. Además se ha detectado que mujeres que presentan PE, en el futuro tienen un riesgo mayor de desarrollar enfermedades cardiovasculares que aquellas que no han sufrido el síndrome. ( Irgens *et al.*, 2001).

Es una patología específica de la gestación, secundaria a una reducción de la perfusión de múltiples órganos, al vasoespasmo y a la activación de la cascada de la coagulación. Por ello se considera un síndrome multisistémico caracterizado por vasoconstricción, cambios metabólicos, disfunción endotelial, activación de la cascada de coagulación e incremento de la respuesta inflamatoria, entre otros sistemas orgánicos afectados. (Roberts *et al.*, 2003).

Todo esto tiene su debut clínico después de la semana 20 de la gestación, o más temprano en el caso de coexistir con la aparición de enfermedad trofoblástica como mola hidatiforme o hydrops.

Indudablemente, la placenta esta envuelta y es la clave en los mecanismos de patogenicidad. La prueba de ello es por un lado que la enfermedad puede aparecer sin embrión presente en un embarazo molar y por otro, que una vez la enfermedad es evidente clínicamente, solo puede ser curada mediante la inducción del parto y la finalización del embarazo (Roberts, 2001).

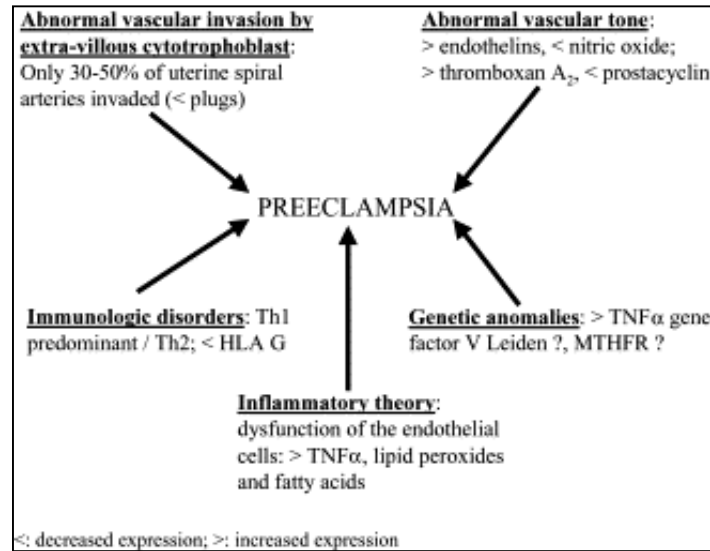
La manifestación clínica de la PE, se caracteriza por la existencia de hipertensión de nueva aparición (>140/90mmHg), proteinuria (>0.3g/l) y edema. La

morbimortalidad perinatal en este grupo de pacientes es consecuencia de la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y de prematuridad iatrogénica debida al deterioro materno o de la condición fetal (25% de bebés con bajo peso nace con peso por debajo de 1500g).

Existen clasificaciones de la PE realizadas en función de varios factores: PE de aparición temprana o tardía, de gravedad media o severa y en síndrome materno o fetal (Sibai *et al.*, 2005).

A pesar de que el cuadro clínico está ampliamente caracterizado, la etiología de la enfermedad es todavía desconocida. Se la considera una enfermedad de las fases iniciales del embarazo, que precede incluso al momento de la implantación. Empieza en la fase folicular, pero a pesar de esto, la sintomatología no aparece hasta el 2-3 trimestre de la gestación, es multifactorial desde el punto de vista fisiopatológico y eso hace complicada su predicción y tratamiento. Se postula que la causa son los numerosos factores que están implicados en la patogénesis de la PE incluyendo genéticos, inmunológicos, ambientales y de conducta (Redman, 2005). Se ha encontrado además de la anomalía en la invasión trofoblástica, alteraciones locales del tono vascular, del balance inmunológico y el estado inflamatorio, en algunos casos asociado con la existencia de predisposición genética tal y como se muestra en la figura 1 (Walker, 2000).





*Figura 1: Esquemización de las diferentes teorías que existen acerca de los posibles desencadenantes de la PE.*

Dentro de los hallazgos histológicos más frecuentes de la PE, a nivel vascular, encontramos arteriopatías de las pequeñas arterias de la placenta y la decidua, infartos en la porción central de la placenta y trombosis en las vellosidades.

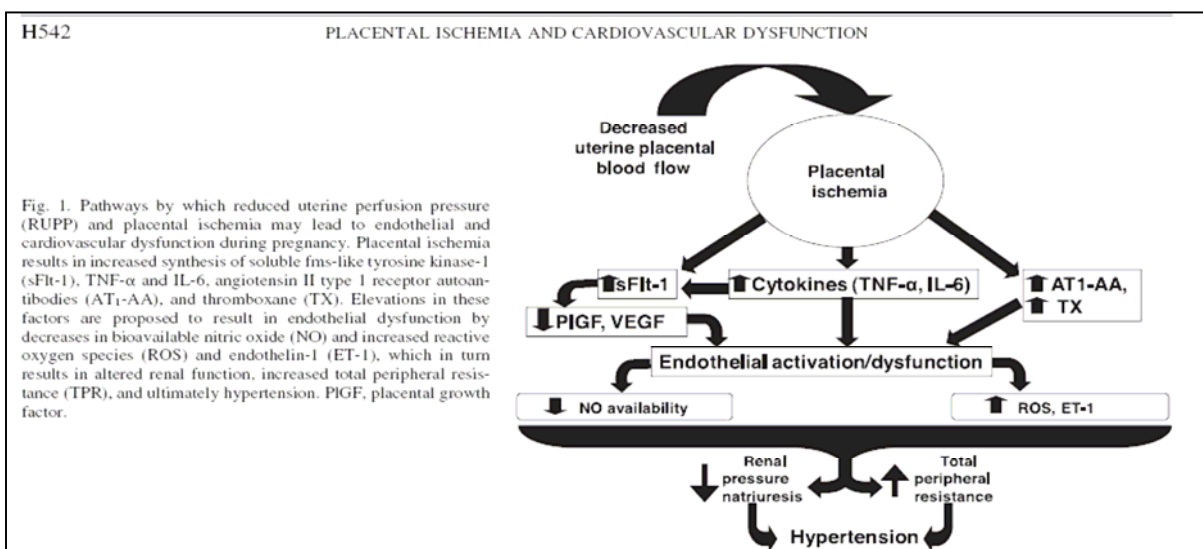
Desde el punto de vista fisiopatológico, un evento clave en el desarrollo de la PE, es la reducción de la perfusión de la placenta en los estados iniciales de gestación. Esto se debe a una invasión trofoblástica defectuosa y superficial de las arterias espirales, lo que conduce al pobre desarrollo de la placenta inmadura y del aporte sanguíneo materno.

En una gestación normal, estos vasos están sometidos a un proceso continuo de remodelación de forma que el diámetro de la luz vascular se incrementa unas 4 veces y la pared del vaso se modifica debido a la pérdida de la capa muscular y la lamina elástica interna. Esto transforma los vasos en unos tubos laxos que proveen al espacio intervilloso mediante un flujo de baja resistencia.

En el caso de la PE, esta remodelación no ocurre de forma adecuada. Estudios Doppler del flujo uterino, han mostrado la existencia de elevadas resistencias en los vasos que abastecen el espacio intervelloso en mujeres con PE, lo que respalda la hipótesis de la invasión defectuosa (Roberts y Gammill, 2005).

Por otro lado, la placenta hipóxica y mal perfundida, es capaz de sintetizar y liberar una mayor cantidad de factores vasoactivos que pueden ser la causa de la activación / disfunción generalizada del endotelio materno en los vasos del riñón y otros órganos.

Son numerosos los estudios destinados a la detección de estas moléculas en la sangre materna y es muy compleja la interrelación de ellas con los mecanismos fisiológicos de la placentación. Sin embargo el fundamento de todos ellos es la obtención de un marcador precoz de esta enfermedad (*figura 2.*)



**Figura 2:** Resumen de los mecanismos que desencadenan la hipertensión materna como consecuencia de la aparición de isquemia placentaria y disfunción endotelial.

Aunque no es el objeto de esta tesis, son ejemplos a destacar de este tipo de moléculas: la forma soluble de la tirosin quinasa-1 (sFlt-1), citoquinas y, posiblemente, la angiotensina II (Ang II). Todas estas moléculas, se cree que son la causa en última instancia, de la hipertensión que caracteriza la enfermedad ( Gilbert *et al.*, 2008)

Es por esto que la PE se considera una enfermedad en dos fases, la primera esta constituida por la deficiente placentación y la segunda, caracterizada por el síndrome materno clínicamente reconocible (Tranquilli y Landi 2010.). Esto se puede equiparar con dos fenómenos sucesivos e interdependientes, necesarios para llevar a cabo de forma adecuada el proceso de formación de la placenta (Hustin 1995; Hustin 1988). Ocurren entre la semana 8 y la 12 el primero y de la 13 a la 18 el segundo.

## **2. Placentación. Etapas:**

**2.1 La primera invasión vascular por el citotrofoblasto.** El trofoblasto se comporta como un “pseudotumor” invadiendo al endometrio, que lo tolera de una forma controlada. Cualquier anomalía en el equilibrio que existe entre los factores que promueven y los que limitan esta invasión, puede causar enfermedades relacionadas con la gestación. La PE es una de ellas (Zhou *et al.*, 1993).

Entre la semana 8 y la 12, las células del citotrofoblasto avanzan hacia los vasos de la decidua materna gracias a la existencia de unos receptores comunes en la superficie de ambos tejidos que hacen que las células se diferencien y proliferen en dos sentidos. El citotrofoblasto, permanece en la pared externa de los capilares deciduales y

en las ramas intra-deciduals de las arterias espirales, creando una red alrededor de estos vasos.

Por otro lado, tenemos el citotrofoblasto extravascular (EVCT) que es el que migra hacia la luz endovascular, formando unos tapones o “plugs” que permiten enlentecer la circulación de sangre materna y poner en contacto íntimo las células del trofoblasto con las células sanguíneas. Esto da lugar a lo que posteriormente supondrán los sinusoides placentarios de intercambio. (Meekings *et al.*, 1997)

En esta primera oleada de invasión del trofoblasto existen dos factores importantes, uno es la presión parcial de O<sub>2</sub> y otro, la homeostasis en los espacios intravasculares.

Con la formación de los tapones, justo por encima de ellos, la presión parcial de O<sub>2</sub> aumenta, con lo que se disminuye la producción de sustancias vasoconstrictoras y antiagregantes como la endotelina 1(ET-1) y el tromboxano 2 (TXA<sub>2</sub>) y aumentan sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (ON) y la prostaglandina (PGI<sub>2</sub>). Con ello conseguimos una difusión más fácil de oxígeno en un flujo enlentecido por las sustancias vasodilatadoras y en un estado de hipocoagulabilidad. En preeclampsia al igual que en abortos espontáneos, existe una disminución en la formación de los tapones (Jaffé *et al.*, 1995).

El oxígeno actúa como un potente regulador del desarrollo vascular. Las células endoteliales (Phillips *et al.*, 1995) y los progenitores hematopoyéticos (Adelman *et al.*, 1999) proliferan en respuesta a la baja concentración de oxígeno. Existen estudios que demuestran que cultivar bajo condiciones de hipoxia las células del trofoblasto humano, hace que estas proliferen, mientras que si las condiciones de cultivo cambian a altos niveles de oxígeno, la proliferación se ve inhibida y en su lugar, se promueve en las células el proceso de diferenciación. (Genbacev *et al.*, 1997; Caniggia *et al.*, 2000).

En sangre materna se ha visto que moléculas que se encontraban elevadas en el estado hipóxico inicial, sufren un descenso a partir de la semana 10<sup>a</sup>. Se sabe que las células placentarias detectan los cambios que se producen en la concentración de oxígeno. Uno de los factores implicados en la regulación del proceso de detección del oxígeno ha sido descubierto recientemente, es el factor inductor de hipoxia (HIF) que pertenece a la familia de factores de transcripción HIF. (Caniggia *et al.*, 2000).

De todos ellos, cabe destacar a HIF-1 $\alpha$ , un activador transcripcional que funciona como regulador global de la homeostasis del oxígeno y también participa en los mecanismos de detección del oxígeno (Tranquilli y Landi, 2010).

La expresión de HIF-1 y de un inhibidor de la diferenciación de trofoblasto, el “factor de transformación del crecimiento (transforming growth factor)” TGF $\beta$ 3, permanece elevada hasta la semana 10 de gestación que es cuando empiezan a elevarse los niveles de oxígeno.

En modelos de PE bajo hipoxia mantenida, encontramos elevados los niveles tanto de HIF-1 como TGF $\beta$ 3 una vez superada la primera invasión trofoblastica y esto hace que las células del citotrofoblasto mantengan un fenotipo proliferativo no-invasivo, lo que da lugar a una invasión trofoblastica mucho más superficial que predispone a la enfermedad. (Caniggia *et al.*, 2000)

**2.2 Segunda invasión vascular por el citotrofoblasto.** En la segunda oleada entre la semana 13 y la 18, las células de los tapones de trofoblasto se movilizan y avanzan hacia las arterias miométriales y van sustituyendo su capa elástica. Ello produce un hiperaflujo hacia el embrión en formación, que se traduce hemodinamicamente en la caída de flujo sanguíneo y la disminución de la resistencia en las arterias uterinas maternas.

Por otra parte, la presión parcial de oxígeno en el espacio intervelloso, además de lo visto, es responsable de modificar los cambios en las dimensiones de las vellosidades y de la formación de los capilares. La expresión clínica de la alteración en la placentación, en el caso de la PE, conlleva una serie de cambios hemodinámicos que se traducen en alteraciones del flujo materno-fetal más tardíamente y que son la base del pronóstico de la enfermedad. Existe una disminución del flujo al feto, con una calidad de perfusión y de oxigenación pobre y desigual, que acaba produciendo una hipoxia relativa en las vellosidades de la placenta o a una lesión de tipo isquemia/reperfusión (Myatt, 2010).

### **3.- Factores vasomotores: papel del óxido nítrico (ON) en la placentación.**

En un embarazo normal junto a una disminución de las resistencias vasculares sistémicas y uterinas, existe también una respuesta reducida a diferentes agentes vasopresores.

Los vasos útero-placentarios están sujetos a la acción de diversos factores que regulan su tono vascular, principalmente actúan sobre él dos sistemas vasomotores opuestos: sistema vasoconstrictor (endotelina/enkefalinas) y sistema vasodilatador (óxido nítrico /guanilato ciclasa). El equilibrio entre ambos sistemas, es el que permite la regulación del tono vascular placentario y en último punto un aporte sanguíneo adecuado.

Enfermedades como la PE están caracterizadas por el desequilibrio de este sistema (Seligman *et al.*, 1994).

Cuando la integridad del sistema vasomotor esta intacta, la endotelina produce un vasodilatador altamente lábil, que permite la regulación local del flujo sanguíneo.

Este vasodilatador es el ON, un gas que tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares y penetrar en las células musculares que rodean los vasos, donde alcanza su diana, el enzima guanilato ciclasa.

Este enzima es el encargado de la formación de Guanosin monofosfato cíclico (GMPc), el segundo mensajero del ON, que activa las protein kinasas intracelulares y permite que las células musculares se relajen. Más tarde, el GMPc es degradado por el enzima fosfodiesterasa (PDE).

El oxido nítrico se sintetiza a partir de L-arginina mediante el enzima oxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS que han sido identificadas en la placenta tanto de humanos como de ratas y ovejas. (Zarlingo *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 2002) . Dos de ellas, son constitutivas y requieren calcio para actuar, son la NOS endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS). La tercera isoforma es inducible (iNOS).

Las eNOS esta presente en arteria uterina y umbilical así como en los vasos coriónicos y las vellosidades placentarias. Tanto la eNOS como la iNOS, están presentes durante todo el embarazo aunque parece que el papel de la iNOS es mas relevante durante el primer trimestre (Morris *et al.*, 1992; Sooranna, 1995; Ramsay *et al.*, 1996).

La relajación de las arterias espirales que como hemos visto se produce con la segunda oleada de invasión trofoblastica, se promueve por acción del GMPc, que se produce vía ON y parece preceder, temporalmente, a la invasión de estos vasos por parte de las células del trofoblasto.

Cuando la PE aparece, existe una modificación del equilibrio vasomotor con un predominio vasoconstrictor. El incremento del ratio vasoconstricción/ vasodilatación es

proporcional a la severidad del síndrome y se ha visto, además, que los niveles de metabolitos del ON también están disminuidos. (Merviel *et al.*, 2004)

Sin embargo, como pone de manifiesto una revisión de la Cochrane sobre el uso de sustancias donantes de ON para la prevención de preeclampsia (Meher y Duley, 2007), a pesar de la importancia y del papel del ON, no hay suficiente evidencia en los estudios clínicos revisados para el empleo de sustancias donantes de ON (glyceryl trinitrate) o precursores (L-arginina) para su uso terapéutico en preeclampsia.

Durante el embarazo normal, tanto la excreción urinaria de GMPc como de nitratos y nitritos (metabolitos del ON) está aumentada (Myatt *et al.*, 1991). A pesar de esto todavía no podemos determinar claramente si hay una disminución global de ON en gestantes con preeclampsia ya que, se ha visto una disminución de sus metabolitos en orina pero, no se ha podido demostrar en plasma (Shaamash *et al.*, 2002).

Igualmente, los intentos de tratamiento con donantes de ON, no han resultado eficientes (Meher y Duley, 2007; Lees *et al.*, 1998)

#### **4.- El modelo animal como aproximación al conocimiento de la fisiopatología de la PE.**

El desarrollo de modelos animales de PE para el estudio de los mecanismos que se ven alterados en el establecimiento de la circulación materno-fetal es fundamental. El desarrollo de la placenta murina es similar al del embrión humano, se compone de tres poblaciones celulares distintas: trofoblastos del laberinto, espongiotrofoblastos y células gigantes (Adelman *et al.*, 2000). En la rata el número de capas que separan a madre y feto son 3 (placenta hemotricorial), mientras que en humano es una única capa (hemomonocorial), (De Rijk *et al.*, 2002).



La capa más interna de la placenta, la del laberinto, esta formada por trofoblastos sincitiales, estos rodean los vasos fetales que invaden la placa coriónica y se interdigitan con los sinusoides maternos, para favorecer el intercambio gaseosos y de nutrientes. En segundo lugar, situada en el medio encontramos la capa de espongiotrofoblastos diploides, que son homólogos a los citotrofoblastos en humanos. Finalmente, la capa más externa, la forman las células gigantes poliploides, cuya principal función es la invasión de tejidos maternos, al igual que los citotrofoblastos invasivos en la placenta humana (Cross, 2000).

No existe actualmente ningún modelo animal de PE que reproduzca fielmente el cuadro clínico. Un modelo desarrollado en ratas tratadas con un inhibidor de la NOS, el L-nitro arginina metil ester (L-NAME) se ha usado ampliamente para el estudio de la PE. Las ratas desarrollan un síndrome similar a la PE con hipertensión y proteinuria y los fetos presentan retraso del crecimiento intrauterino (Fernández-Celadilla *et al.*, 2005; Buhimischi *et al.*, 1995; Molnar *et al.*, 1994).

#### **5.- PE y posibles dianas de actuación. Inhibidores de la Fosfodiesterasa 5.**

Como hemos visto, por un lado el ON y su segundo mensajero, el GMPc, son dos factores importantes sobre los que actuar a la hora de probar nuevas terapias para la prevención y el tratamiento de la PE o, en su lugar, paliar la sintomatología y los efectos fetales que produce. Por otro, sabemos que el mantenimiento de la vasodilatación, en los vasos maternos ya existentes o en los de nuevo desarrollo es un factor crucial para el desarrollo de la placenta (Kaufman *et al.*, 2004).

Turgut *et al.* han propuesto que en casos de PE, los inhibidores de la degradación del GMPc, pueden incrementar sus niveles celulares, favoreciendo así la función endotelial, por lo tanto, podrían ser utilizados como mecanismo de protección (Downing *et al.*, 2004). Apoyando la hipótesis, se ha visto un incremento de la actividad PDE sérica en mujeres con preeclampsia (Miller *et al.* 2009).

Estudios “in vitro” previos, realizados sobre biopsias de pequeñas arterias miometriales y omentales de pacientes con RCIU y PE (Wareing *et al.*, 2005-2006), ponen de manifiesto que el Sildenafil (SC) actúa como un potente vasodilatador, que mejora y prolonga la acción de GMPc por inhibición selectiva de la fosfodiesterasa tipo 5, el enzima que convierte la concentración intracelular de GMPc como segundo mensajero, en su forma inactiva.

Tanto en miometrio, como en el lado materno de la placenta, se han detectado más receptores de la PDE5 que en otros vasos maternos, por lo que el uso de SC podría tener un efecto selectivo sobre ellos (Coppage *et al.*, 2005; Buhimschi *et al.*, 2004).

Estudios “in vivo” de administración de SC a animales durante el embarazo, se han centrado en demostrar los efectos sobre la hemodinámica y el peso fetal. Una amplia revisión sobre el tema destaca, que SC produce un incremento del flujo uterino en ovejas y además actúa como agente tocolítico, ya que produce relajación muscular al reducir la presión intrauterina en ratas (Villanueva-Garcia *et al.*, 2007). Ahora bien, recientemente se ha publicado un estudio donde la administración de SC no mejora la perfusión uterina, aunque la administración se realiza de forma aguda sobre un modelo animal de RCIU producido por la ligadura de una umbilical, lo que da lugar a una situación muy rápida de isquemia aguda seguida de administración de SC (Miller *et al.*, 2009).

Dentro de los efectos que SC produce en los fetos, destaca el aumento del peso fetal tras administrarlo de forma tardía en el embarazo normal (Belik *et al.*, 2005) y en animales sometidos a hipoxia (Refuerzo *et al.*, 2006).

En resumen, los estudios experimentales sugieren que SC, puede mejorar el flujo sanguíneo uterino, a través de la relajación endotelial de los vasos uterinos, producida por la liberación de GMPc, además de jugar “in vivo” un papel fisiológico como modulador directo de tono del músculo liso vascular durante el embarazo.

En humanos, su uso establecido en el campo de la disfunción sexual masculina, ha permitido establecer un amplio rango en la seguridad y manejo de la droga (Ghofrani *et al.*, 2006). Investigaciones clínicas realizadas, han demostrado que los mecanismos celulares por los que los inhibidores de la PDE 5, en humanos, mejoran la función endotelial y la supervivencia celular, en situaciones críticas después de la isquemia y la reperfusión, pueden ser una terapia prometedora (Conrad *et al.*, 1999). Por ello cada vez más, se amplía el efecto vasodilatador del SC en otras áreas médicas. Los trastornos relacionados con el sistema nervioso central, la insuficiencia cardíaca y el sistema pulmonar son ejemplos. (Gori *et al.*, 2005)

En animales, sobre el embarazo se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la seguridad de su administración, estos han concluido que no existe un efecto fetotóxico o teratogénico al administrarlo a dosis elevadas (200mg/Kg) de forma diaria durante la fase de organogénesis. Además, efectos producidos sobre crías de ratas que recibieron SC durante el embarazo y hasta el final de la lactancia fueron mínimos. Los estudios animales concluyen por tanto que SC no tiene efectos adversos sobre la fertilidad, ni

efectos teratogénicos o potencial carcinogénico. Sin embargo, debemos ser cuidadosos al extrapolar resultados a humanos (Abbot *et al.*, 2004).

Los pocos casos que hay publicados sobre su administración eventual a mujeres gestantes con hipertensión pulmonar han mostrado un aumento del peso fetal en el nacimiento, sin otras alteraciones descritas (Lacassie *et al.*, 2004; Molelekwa *et al.*, 2005). Cuando SC ha sido administrado a mujeres no gestantes por vía intravaginal, se ha visto un aumento del flujo sanguíneo uterino y del desarrollo endometrial. (Sher y Fisch, 2002)

Recientemente, se ha administrado por primera vez SC, de forma aguda y tardía, a mujeres embarazadas con preeclampsia grave. En este estudio, las pacientes recibían 3 dosis diarias de SC, la dosis administrada se iba incrementando cada 3 días, llegando a un valor máximo de 80mg, 3 veces al día. El estudio concluye que la administración de SC no prolonga el tiempo hasta el parto, aunque si mejora los valores de tensión 2 semanas después de este. En los fetos, SC no produce ningún cambio en el Apgar a 1 y 5 minutos ni altera el pH de la sangre de cordón. Por tanto, aunque el momento y la forma de administrar la sustancia no ha representado una clara mejoría de la enfermedad, es importante destacar que no se ha descrito una mayor morbilidad y mortalidad en la descendencia (Samangaya *et al.*, 2009).

#### **6.- Efectos de la PE sobre el desarrollo neurológico fetal. Daño cerebral.**

Existen pocos estudios dirigidos a valorar el daño neurológico intraútero dada su complejidad. Son aun más escasos los estudios acerca de la implicación etiológica de una situación de hipoxia cerebral fetal en el posterior desarrollo postnatal de las funciones cognitivas.

Prematuridad, hipoxia, isquemia e inflamación, son factores que predisponen al daño cerebral perinatal, pero se desconocen los mecanismos mediante los que actúan y en que momento aparecen. El parto se establece como una situación de hipoxia aguda, que hace difícil discernir si la causa del daño es previa o no al nacimiento.

La encefalopatía neonatal (EN) ocurre en 1 –6 de cada 1000 nacimientos a término y es la principal causa de discapacidad en el neurodesarrollo. El 15-20% de los niños afectados muere durante el período postnatal, y un 25% adicional presenta déficits permanentes. Los más frecuentes son afectación de las funciones motoras y déficit cognitivos.

Los déficits de las funciones motoras son conocidos como parálisis cerebral, son desordenes posturales o motores no progresivos cuyo origen está en la vida temprana.

Los déficits cognitivos incluyen retraso mental o funciones intelectuales alteradas, lo que da lugar a déficits en el lenguaje, aprendizaje, funciones ejecutoras y habilidades sociales.

Una gran parte de los casos de encefalopatía neonatal, son debidos a encefalopatías hipóxico-isquémicas (HIE), a pesar de que en muchos de los casos no se ha documentado un episodio hipóxico-isquémico (González *et al.*, 2006).

Se calcula, según los estudios histopatológicos que en torno al 80% de los casos tienen su origen intraútero. De Vries *et al.* en 2004 describieron la existencia de hemorragias peri-ventriculares en fetos procedentes de insuficiencia placentaria o preeclampsia. Estas son detectadas por la aparición de ecodensidades diferentes en los ventrículos cerebrales, aunque no se ha descrito todavía una correspondencia clara entre el lugar de visualización de la ecodensidad y el posible daño que ese niño desarrollará

en el futuro, tal y como después detallaremos. En humanos no existe ninguna prueba diagnóstica con suficiente sensibilidad para detectar daño cerebral prenatal.

La probabilidad de sufrir EN se incrementa con la edad materna y disminuye al aumentar la paridad. Además existen otros muchos factores previos o que afectan al embarazo, como la PE, que incrementan este riesgo.(Badawi *et al.*, 1998)

En condiciones normales, la liberación de O<sub>2</sub> en el cerebro es constante, ya que esta descrito que en ausencia de cambios en la presión de perfusión sanguínea, la hipoxemia y/o hipercapnia fetal, provoca un incremento en el flujo cerebral que es proporcional al grado de alteración del intercambio de gases (Helou *et al.*, 1991). La hipoxia fetal producida por una mala perfusión materna produce una redistribución sanguínea hacia órganos vitales como el cerebro, las glándulas adrenales y el miocardio.

Se ha visto que a los 5 años de edad, la función cognitiva esta disminuida en niños sometidos a insuficiencia placentaria. Esto constituye, un efecto negativo de la mala placentación sobre el desarrollo neuronal.(Scherjon *et al.*, 2000).

La hipoxia cada vez se ve más como un mecanismo protector, de ahí que la PE no muestre una relación clara con el daño neurológico (Nelson *et al.*, 1995). A pesar de la redistribución del flujo sanguíneo hacia el cerebro se postula que esta puede no ser suficiente para mantener un desarrollo neurológico normal (Rees, 1998), lo que explicaría un Odds ratio de 6.3 para EN en los hijos de madres con PE (Nelson y Grether, 1995).

Uno de los pocos estudios donde se examina la anatomía patológica del cerebro neonatal en esta situación es el realizado por Bell en una cohorte escocesa de 700

neonatos con encefalopatía neonatal (Bell *et al.*, 2005). De toda la cohorte eliminaron los cerebros que habían sufrido asfixia intraparto, así finalmente relacionan HIE con eosinofilia neuronal y daño preferentemente en la sustancia blanca con mayor grado de astrocitosis. Otros estudios de neuroimagen asocian retraso del crecimiento intrauterino con la atrofia cortical y en el área del hipocampo y con anisotropía (Thompson *et al.*, 2007).

En animales (roedores, ovejas y monos) se han desarrollado modelos para el estudio a largo plazo de los efectos de la HIE (González *et al.*, 2006). Son modelos relativamente sencillos para extrapolar resultados a un proceso patológico tan complejo, en ellos se relaciona la HIE con un retraso en el desarrollo de la capacidad de aprendizaje, orientación e hiperactividad (Jänicke y Coper, 1994). En una extensa revisión, se establece que estas alteraciones evolucionan a lo largo de la vida, ya que aparecen en la juventud y se normalizan en la edad adulta para volver a reaparecer en la madurez, solo en el desarrollo de tareas complejas (González *et al.*, 2006).

La duración de la hipoxia y la edad gestacional son dos de los factores determinantes de la extensión del daño cerebral. En general los estudios muestran que las neuronas son más resistentes a la hipoxemia crónica pero toleran mal el descenso brusco de oxígeno.

La vía ON-GMPc juega un importante papel en la modulación de algunos tipos de aprendizaje, por lo que una disfunción en esta vía, puede estar relacionada con la afectación cognitiva que se observa en niños nacidos de madres que han desarrollado PE.

Existen estudios en modelos animales que muestran que la administración de sildenafil, restablece la función de la vía ON-GMPC y la capacidad de aprendizaje en ratas que sufrían encefalopatía hepática incluyendo el deterioro cognitivo. Basandonos

en estos estudios, hipotetizamos que la administración de sildenafil en un modelo animal de PE, podría recuperar algunos de los defectos neurológicos que presenta la descendencia (Erceg *et al.*, 2005).





## **II.- HIPÓTESIS**

## **II.- HIPÓTESIS**

**La administración continuada de sildenafil durante el embarazo es capaz de atravesar la placenta y revertir de forma segura los efectos que un modelo de preeclampsia animal produce en la madre y en su descendencia.**

### **III.- OBJETIVOS**

### **III.- OBJETIVOS**

#### **Objetivo principal:**

- Efectos del sildenafil sobre un modelo animal de preeclampsia. Demostrar el paso, del sildenafil, a través de la placenta y valorar su efecto en el feto y el desarrollo de su sistema nervioso central.

#### **Objetivos secundarios:**

1. Detección y cuantificación de la molécula de sildenafil en plasma e hígado materno y en hígado fetal a lo largo de la gestación.
2. Evaluación y validación del modelo animal de preeclampsia , estudio de la función hemodinámica materna y fetal mediante tecnología Doppler.
3. Efectos que la administración continuada de sildenafil durante el embarazo produce durante la gestación normal y patológica.

Comparación con resultados en no gestantes

- 2.1.- Tensión arterial materna.
- 2.2.-Crecimiento intrauterino y postnatal
- 2.3.-Morbimortalidad perinatal.
- 2.4.-Crecimiento placentario.
- 2.5-Serie celular hematopoyética materna y peso del hígado fetal.
- 2.6.-Parámetros hemodinámicos materno-fetales valorados con tecnología Doppler.
- 2.7.-Desarrollo sistema nervioso central (SNC) post natal.

## **IV.- MATERIAL Y METODOS**

## **IV.-MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **Elección del modelo animal**

La elección de un modelo animal de embarazo en ratas fue debida no solo a la literatura existente al respecto sino también, a que este animal nos permite la obtención de un gran número de crías por madre, en un tiempo relativamente corto (22-23 días). Esto nos permite ver los posibles efectos de diferentes fármacos tanto sobre el desarrollo del embarazo como en la descendencia en un breve espacio de tiempo.

Así pues aunque el modelo presenta ciertas limitaciones a la hora de extrapolar resultados en humanos y ciertas complicaciones técnicas debido al pequeño tamaño del animal, es más práctico, económico y factible que otros modelos hechos con mamíferos superiores descritos en la literatura.

#### **1. Desarrollo del modelo.**

Gracias a la colaboración de la Dra. Fernández Celadilla de León, obtuvimos el conocimiento necesario para la puesta en marcha del modelo. Se seleccionaron ratas hembra *Wistar* (Charles River, Francia), de entre 200-250 gramos de peso (10-12 semanas), que fueron estabuladas en las salas del animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF.)

Los animales fueron mantenidos, tratados y sacrificados de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité de Ética y Bienestar Animal del CIPF. Todos los procedimientos cumplen con la legislación vigente de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, RD 1201/ 2005 y Decreto 13/2007 del Consell.

Se colocó a los animales de dos en dos, en jaulas dispuestas en racks ventilados, conectados a un sistema de aire con filtros HEPA. Sometidos a ciclos de 12h de luz / oscuridad, humedad relativa del  $55 \pm 10 \%$  y temperatura de 22-24°C. Recibiendo comida standard y agua ad libitum.

Tras un periodo de aclimatación de dos semanas, se procedió al embarazo de los animales. Para ello se determinó el momento del ciclo estral mediante el uso de un impedancímetro (Cibertec SA, Madrid, España), así las hembras en *proestro* fueron puestas esa noche con machos (2:1). A la mañana siguiente se comprobó la presencia de espermatozoides (“*plug*”) en la vagina de los animales mediante la realización de un lavado vaginal. Aquellas hembras en las que se observó este “*plug*” fueron consideradas en día 0 de embarazo.

El ciclo de embarazo de la rata, es de aproximadamente 22-23 días y a ellos nos referiremos como E1, E2....E22 (del inglés “*embryonic day*”). Se ha descrito que la rata inicia su segundo trimestre de embarazo el día E9.5-10 (De Rijk *et al.* 2002; Caluwaerts *et al.* 2005) y el día E16 estaría ya en tercer trimestre. Tomamos como representativo de cada trimestre E8, E11 y E18 para realizar los experimentos.

#### GRUPOS DE ESTUDIO:

Estas hembras en día 0 de gestación fueron asignadas a 4 grupos de experimentación.

- ***Grupo L-NAME o Preeclampsia (PE).***
- ***Grupo L-NAME + Sildenafil (PE+SC)***
- ***Grupo Sildenafil (SC)***
- ***Grupo Control (CTRL.)***
- ***Grupos No gestantes (NO GEST)***



El grupo preeclampsia (PE, n=21) recibe un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, L-Nitro Arginina Metil Ester, a una dosis de 50mg/Kg/día disuelto en el agua de bebida. Los tratamientos se preparan diariamente a las 9 a.m. para asegurar su frescura y evitar pérdidas.

Al grupo PE+SC, también se le administra L-NAME a la misma dosis y de la misma forma, así desarrolla PE pero además se le administra de forma adicional sildenafil citrato (grupo PE+SC, n=17) una dosis diaria de 4mg/Kg/día (Erceg *et al.*, 2005; Gómez-Pinedo *et al.*, 2010), disuelto en el mismo agua que el L-NAME.

El grupo SC(n=25) recibe únicamente sildenafil citrato disuelto en el agua de bebida a la misma dosis (4mg/Kg/día).

El grupo Control (n=23) se le administra agua *ad libitum* sin ningún tratamiento.

Para conocer la cantidad de agua diaria que ingieren los animales, una muestra (n=10) fue puesta de forma previa en jaulas metabólicas, donde se monitoriza la cantidad de agua y comida consumida así como la cantidad de orina y heces excretada por los animales.

Los animales que resultaron no estar embarazados pero que habían recibido los tratamientos y los del grupo control, a los que se les monitorizó los mismos parámetros que a los 4 grupos iniciales de estudio; fueron considerados como 4 grupos adicionales de animales No gestantes en los que dilucidar si los posibles efectos de los tratamientos se producían solo en la situación de gestación:

- ***Grupo PE-No gestante (PE-NoGEST, n=6)***
- ***Grupo PE+SC-No gestante (PE+SC-NoGEST, n=5)***
- ***Grupo SC-No gestante (SC-NoGEST, n=6)***
- ***Grupo Control-No gestante (CTRL.-NoGEST, n=6).***

## 2. Medida de la tensión arterial (TA).

Los fármacos administrados tienen efecto sobre el funcionamiento del sistema vascular a través de ON y su segundo mensajero, GMPc. La monitorización de la tensión arterial a lo largo del embarazo es un sistema de control sobre la efectividad de los tratamientos para elección del modelo animal.

Así, en los días de embarazo establecidos E0, E6, E10 y E17 se obtuvieron resultados de la toma de tensión arterial materna (TAM) tal y como se describe:

Los animales de todos los grupos eran seleccionados de forma aleatoria ( $n_{\text{media}}=12$ ) e introducidos en una estufa a 35-37°C durante unos 5 minutos con objeto de conseguir una vasodilatación periférica necesaria para realizar la medición (Fernández-Celadilla *et al.* 2005).

A continuación, cada animal era enrollado en un paño y a nivel de la cola del mismo se coloca el manguito y el pulsímetro. Cuando empieza a normalizarse el registro en la pantalla se realizan las mediciones.

Para ello se utilizó el medidor de presión no invasivo NIPREM 645 (CIBERTEC, S. A., Madrid, España).

Este aparato consiste en un manguito hinchable que se aplica sobre la cola del animal y que envía la señal registrada a un ordenador que lleva instalado el software del aparato. Así, tras obtener los registros, se hacen las consiguientes medidas obteniendo los valores de presión sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca del animal.

Tras estabilizarse la medición, se obtienen de cada animal unos 5-6 ciclos de medida de los que se saca la media para obtener el valor de presión sistólica, que denominaremos tensión arterial sistólica (TAS).

### **3. Control de la proteinuria y bienestar animal.**

En los días 0, 6, 10 y 17 se evalúa el estado general del animal y la proteinuria mediante unas tiras reactivas para la orina (Comburtest10 Roche, Madrid, España).

Con una pequeña muestra de orina, obtenemos con las tiras una valoración cualitativa de los siguientes parámetros: proteínas totales, glucosa, pH, presencia de eritrocitos, cuerpos cetónicos, urobilinogeno, nitritos y densidad de la orina

### **4. Cromatografía líquida-Espectrometría de masas (LC-MS).**

Para determinar la presencia y concentración de sildenafil (SC) y su metabolito activo el desmetilsildenafil (DM-SC), en tejido hepático fetal y materno, así como en plasma, se utilizó la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

Probamos dos métodos de extracción y purificación de las moléculas en los diferentes tejidos estudiados.

Para ello, se pesó y descongeló los hígados fetales previamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se homogeneizaron las muestras utilizando un tubo Plotter hasta su completa disgregación. Añadimos 3 microlitros de Tampón de blotting pH 7.5 por miligramo de peso, y más tarde fueron los homogenizados fueron sonicados. Después se realizó una dilución 1:2 de este homogenizado en agua MiliQ para analizar el contenido en el LC-MS. Por tanto la dilución final de la muestra es 1:6 en hígado y 1:2 en plasma.

El equipo utilizado para el análisis es un Micromass Quattro micro (Shimadzu®), la separación de los compuestos se hizo con una columna Gambini y un flujo de 0.3ml/min. El eluyente pasó directamente al cuadrupolo el espectrómetro de

masas y allí se produjo la ruptura de la molécula. Se determinaron las siguientes transiciones electrónicas para los compuestos: sildenafil  $m/z$  476.6-99.87, desmetilsildenafil  $m/z$  461.1-84.8 y 461.1-283.2; diazepam  $m/z$  285.1-193.1.

Hechos los ajustes técnicos al equipo, para las determinaciones se realizaron curvas patrón de ambas moléculas (SC y DM-SC) en etanol, plasma y agua para determinar el método de extracción de mayor eficiencia. Tanto en las curvas como en las muestras se añadió diazepam como patrón interno.

En primer lugar se probó la extracción con acetonitrilo; así a 100 $\mu$ l de muestra (homogenizado diluido 1:5 en agua MiliQ) se le añadieron 100 $\mu$ l de NaOH 50mM, se agitó y se añadió en último lugar 200 $\mu$ l de acetonitrilo (Sigma, St Louis, Co), se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 11.000 rpm a 4°C. Después se separó la fase acuosa y se evaporó con nitrógeno a 35°C. Finalmente se resuspendió en 100 $\mu$ l de fase móvil, compuesta de 80% formiato amónico 10mM pH3 y 20% de metanol al 20%. En este caso el paso de extracción con acetonitrilo se realizó tres veces. La muestra resuspendida se inyectó en el equipo LC-MS.

Para la extracción con diclorometano usamos 100 $\mu$ l de muestra que se basifica con 100 $\mu$ l de NaOH 50mM, se agitó y extrajo añadiendo 700 $\mu$ l de diclorometano (Sigma, St Louis, Co), agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando después a 11.000 rpm a 4°C. En este caso, el paso de extracción solo se realizó una vez y fue la fase orgánica la que se separó y se evaporó para resuspenderla después en 100 $\mu$ l de fase móvil.

Como patrón interno, para determinar la sustancia en tejido, tras preparar las muestras como se ha indicado se añadió a todas ellas 10 $\mu$ l de una solución 1 $\mu$ g/ml de Diazepam disuelto en metanol por cada 100 $\mu$ l de muestra.

### **5. Sacrificio y toma de muestras:**

E8, E11 y E18, fueron tomados como representativos de cada uno de los trimestres del embarazo.

4-5 hembras de cada grupo en día E8 fueron sacrificadas. Tras anestesiarlas via intraperitoneal (IP) con pentobarbital 60mg/Kg (Braun, Barcelona, España) y fentanilo 0.08mg/Kg (Fentanest, Roche, Madrid, España), se abrió la cavidad abdominal del animal y se extrajo el útero, los riñones y el hígado. También se extrajo de la vena porta 2 ml de sangre.

La sangre extraída de la aorta, se separó en dos partes, un mililitro (ml) se puso en un tubo eppendorf para la obtención de suero y el otro ml se puso en un tubo eppendorf con anticoagulante (tampon Tris 200mM o tampon citrato 3.9%) para obtención de plasma.

Uno de los riñones y el hígado materno fueron congelados en nitrógeno líquido, el otro riñón se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4%.

Los embriones en E8, debido a su tamaño, no fueron separados del tejido uterino (Fernandez-Celadilla *et al.*, 2005) sino que se cortaron las secciones del cuerno uterino de cada lugar de implantación y se pesaron individualmente. La mitad de ellos fue fijado en PFA 4% para su posterior inclusión en bloques de parafina y la otra mitad congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

5 hembras de cada grupo en día E11 fueron sacrificadas siguiendo el mismo protocolo anestésico que en E8. En este caso, los fetos sí fueron separados del tejido uterino y pesados individualmente para la evaluación del crecimiento intrauterino. La mitad de ellos fue fijado en PFA 4% para su posterior inclusión en bloques de parafina y la otra mitad congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

6-9 hembras procedentes de cada grupo fueron sacrificadas en E18 según el mismo protocolo descrito para E11, se procedió a la extracción del útero, los riñones, el hígado y la sangre materna.

De cada madre, se guardó un riñón en PFA4% y otro congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y sangre para obtener suero y plasma.

Para valorar el crecimiento intrauterino, cada feto fue pesado individualmente y se midió la longitud craneo-nalga. También se pesaron los hígados y las placentas. Una muestra de ellos fueron examinados con el fin de detectar posibles anomalías macroscópicas. Las placentas se pesaron y la mitad fueron fijadas en PFA al 4% para su posterior estudio histológico; el resto se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los hígados fetales también fueron pesados y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para la posterior determinación de la presencia de fármacos en ellos, mediante espectrometría de masas.

#### **6. Estudio plaquetario de la sangre materna mediante citometría de flujo.**

5-6 hembras de cada grupo fueron seleccionadas aleatoriamente para el estudio de la función plaquetaria durante el embarazo. Para ello se extrajo, de las venas de la cola del animal muestras de sangre en los días 6, 10 y 17. Concretamente se estudió el número de plaquetas, la celularidad sanguínea y la activación plaquetaria mediante la molécula de superficie P-selectina (CD62P).

Para el conteo de plaquetas se hizo una dilución 1:10 de sangre entera en tampón de Tyrode pH 7.4, suplementado con glucosa 0.55M y BSA al 3.5% (10ul sangre+190 ul Tampón Tyrode). Se puso, en un tubo de polipropileno 12x75 mm, 50ul de esta sangre previamente diluida, 450ul de tampón Tyrode y 50  $\mu\text{l}$  de fluoroesferas (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter Inc, Brea, CA).

Para la valoración de la activación plaquetaria se puso la sangre entera, extraída de la cola, con tampón citrato 3.9% a una razón 1 :4 (20µl sangre + 6.6µl Tampón citrato) para evitar la coagulación.

Esta sangre anticoagulada se diluye 1:10 en tampón Tyrode (10µl sangre anticoagulada + 90 µl tampón Tyrode); se ponen 5 µl de esta dilución en un tubo de polipropileno 12x75mm y se añaden 2 microlitros de una dilución 1:5 de anticuerpo monoclonal anti-CD62P-Alexa Fluor 488 (Lifespan Biosciences, Inc, Seattle, USA); Se incuba esta mezcla 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación se añade 1 mililitro de tampón Tyrodes +glucosa+BSA y se mide la fluorescencia de la muestra en el citómetro.

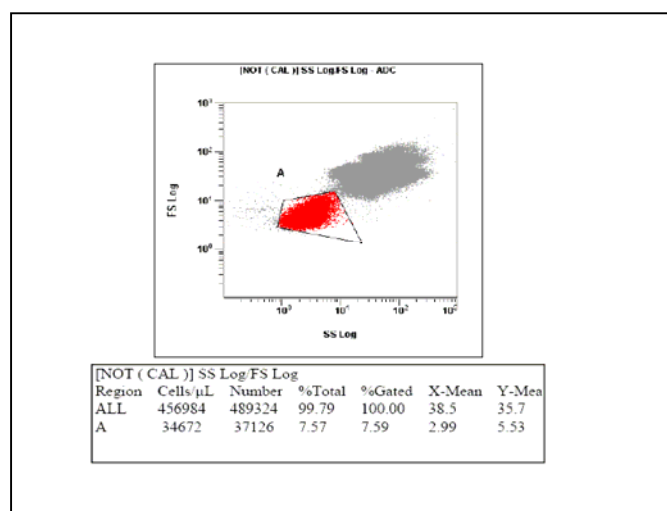
Se determina la autofluorescencia de las muestras poniendo un control negativo que consta de los mismos componentes de las reacciones anteriores, a excepción del anticuerpo anti CD62P, que se sustituye por 2 µl de tampón Tyrodes.

Se incluye también un control positivo que consta de, una muestra de sangre anticoagulada diluida 1:10, procesada como el resto pero que esta suplementada con una mezcla de activación plaquetaria.

Esta mezcla esta formada por trombina (50 UI/ml) y por el inhibidor de la coagulación Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) a concentración de 8.3 mg/ml, ambos componentes se mezclan y su concentración final en la mezcla de activación debe ser 0.72 UI/ml y 0.72 mg/ml respectivamente. En un tubo de polipropileno se añaden 5 µl muestra, 10 µl mezcla activación y 2 µl anti-CD62P diluido 1:10, se incuba 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y tras esto se añade 1 ml de tampón Tyrodes. Así se establece el rango de fluorescencia de las muestras.

Los experimentos se realizaron en un citómetro Cytomics F500 MCL equipado con un laser iónico, refrigerado por aire, que emite a 488nm con el software CXP (Beckman Coulter, Bra, CA).

Para detectar las plaquetas se usó una dispersión delantera del ángulo de la luz y una dispersión lateral en amplificación logarítmica. Las fluoroesferas para el conteo celular y el anticuerpo CD62P-Alexa 488, para la activación plaquetaria, fueron recogidos a 525nm. se puso a punto un protocolo de conteo de plaquetas que hace pasar por el detector 300000 eventos o células y que calibra la muestra con las fluoroesferas de cada tubo para dar una lectura en células/microlitro tanto del número total de células de la muestra como del área seleccionada para las plaquetas (*figura 1*).



*Figura 1: Área de selección de plaquetas del especto celular total por citometria de flujo.*



### **7. Estudio de la supervivencia y la evolución de la descendencia.**

5-6 hembras de cada grupo fueron asignadas a dejar evolucionar hasta el final de la gestación. Tras el nacimiento y contaje de las crías se realizó un registro seriado de los pesos hasta que los animales llegaron a la edad adulta. Se controló semanalmente el peso de cada individuo así como las bajas que iban produciéndose en las camadas. Es importante resaltar que se anotó el sexo de cada animal a partir de los 7-10 días de nacimiento y se tuvo en cuenta a la hora de analizar la evolución del peso y la supervivencia en los tratamientos.

### **8. Valoración de los parámetros hemodinámicos de las arterias uterinas de la rata mediante Doppler pulsado.**

Sobre una muestra de animales pertenecientes a todos los grupos experimentales, se realizó un examen ecográfico para la obtención de parámetros hemodinámicos.

En los días 8, 11 y 18 de gestación se realizó el estudio de las arterias uterinas. Para ello se anestesió a los animales utilizando sevoflurano (Sevorane, Abbot Laboratories S.A. Madrid, España) al 8% en la fase de inducción y se mantuvo al 1.5% durante el resto del procedimiento. Se empleó una sonda lineal 13 MHz probe, protegida con una funda ecográfica rellena de gel de ecografía, en el ecógrafo *GE Medical Systems' VIVID 7 PRO BT04*, (*GE Medical Systems' Horten*, Norway). Tras impregnar el abdomen del animal con alcohol 50°, se procedió a la localización de las arterias uterinas tomando como referencia de localización la vejiga. Tras situarnos sobre ellas se activo el mapa color y se registró una secuencia de ondas de velocidad de flujo de dichas arterias mediante doppler pulsado para su posterior análisis. Se tomaron medidas del pico sistólico (PS), diastólico (ED), índice resistencia(IR) y pulsatilidad

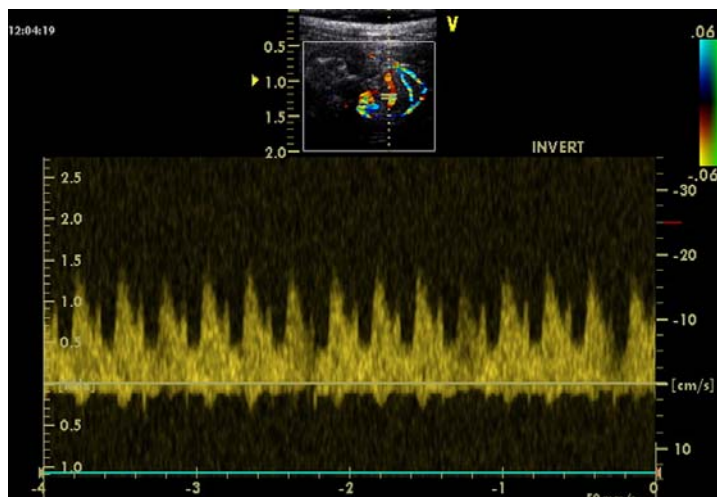
(IP) así como el diámetro (d) y volumen de flujo del vaso (VF). Se realizaron dos medidas de la arteria uterina derecha y otras dos de la izquierda en su porción basal (más próxima a la vagina) para evitar posibles errores de medida.

Cada medida procede de la media aritmética, para ese parámetro, del valor obtenido en 3 ondas continuas con similar forma. Se registró también la frecuencia cardiaca materna en los 3 días de estudio.

### 9. Valoración de los parámetros hemodinámicos del Ductus venoso fetal.

De manera complementaria se realizó un estudio en los fetos en el día 18. Tras confirmar la vitalidad fetal se procedió a la medida del Ductus venoso (DV) de los fetos de las madres del estudio.

En una sección transversal del feto, desplazamos la sonda dorsalmente siguiendo el trayecto de la vena umbilical hasta encontrar el DV que se localiza justo debajo del foco cardiaco. Una vez encontrado, situamos la muestra del Doppler sobre el mismo y activamos el Doppler pulsado para registrar la onda (*figura 2*).



**Figura 2:** Onda obtenida del Ductus venoso fetal mediante ecografía Doppler.

Se repitió el registro en cada feto y se midieron los siguientes Índices de flujo venoso: Índice de pulsatilidad venoso (IPV) y ratio *S-a/S*. ( DeVore *et al.*, 1994; Hecher *et al.*, 1994). También se tomó registro en estas ondas de la frecuencia cardiaca fetal.

Tras esto, se procedió al sacrificio de los animales y no se utilizaron para ningún otro fin, ya que sus parámetros podían estar afectados por la realización de este estudio (exposición a anestésicos, ecografía...). Esta muestra de animales, debido a su manipulación, fueron sacrificados tras obtener los parámetros de deseados.

## **10. Evaluación del efecto de los tratamientos en el desarrollo neurológico de la descendencia.**

8-10 machos de cada tratamiento al alcanzar la edad adulta, fueron seleccionados para la valoración de los posibles efectos de los tratamientos sobre el desarrollo neurológico de las crías. Los test se realizaron únicamente en crías macho porque está demostrado que no existen diferencias entre los sexos para estos test. Así que como por cuestiones técnicas no pueden hacerse en ambos sexos a la vez (n=64 crías) y además la mayoría de datos publicados sobre el desarrollo neurológico de la descendencia corresponden a los machos, a la hora de comparar con lo publicado los resultados decidimos que era más fiable realizar los test en machos.

### **10.1 Test de aprendizaje de discriminación condicional en el laberinto en Y**

Se realiza utilizando un laberinto de madera en forma de Y en el que los tres brazos son iguales (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de altura). Uno de los brazos se elige como brazo de salida, al principio del cual se coloca al animal y los otros dos son los brazos de elección. El color de las paredes del laberinto se puede modificar, pudiendo ser blanco o negro. En función del color del laberinto la comida se colocará al

final de uno u otro brazo. Cuando el color es blanco la comida se coloca en el lado derecho y cuando el color es negro se coloca en el lado izquierdo. El animal debe aprender en que brazo está la comida en función del color de las paredes.

El color del laberinto se modificaba de uno a otro color mediante piezas blancas o negras que se insertan en el laberinto y encajan perfectamente cubriéndolo todo.

Antes de empezar los tests se realizó un proceso diario de preentrenamiento durante cuatro días para que las ratas fueran familiarizándose con el laberinto. El primer día se ponen dos ratas a la vez durante 10 minutos en el laberinto con las paredes de color negro y se coloca la comida por todo el laberinto. El segundo día cada rata se deja 10 minutos en el laberinto con las paredes de color blanco y se coloca la comida por todo el laberinto. El tercer día de preentrenamiento cada rata se deja 5 minutos en el laberinto con las paredes negras con la comida colocada al final de los dos brazos de elección. El cuarto día cada rata se dejó 5 minutos en el laberinto de color blanco con la comida al final de los brazos de elección. Durante la realización del test cada rata se sometía a diez ensayos cada día en los cuales unas veces el laberinto era blanco y otras negro, sin seguir siempre una misma pauta.

Cada vez que una rata se sometía al test se dejaba como máximo tres minutos en el laberinto, de forma que o bien realizaba un acierto (iba hasta el final del brazo correcto) o un error (iba hasta el final del brazo donde no estaba la comida) o un no ensayo (se quedaba en el brazo de salida).

Se considera que una rata ha aprendido la tarea cuando lo hace bien en todos los tests de un mismo día, es decir las diez veces seguidas.

Si a los veinticinco días de la realización de los tests la rata no había aprendido ya no se le hacían más tests y se consideraba que no era capaz de aprender la tarea.

### **10.2 Test de coordinación motora ROTAROD.**

El test de coordinación motora rotarod, consiste en poner al animal sobre una superficie o rueda que rota sobre un eje y va cambiando la velocidad de giro pasando de 4rpm a 40 rpm en cinco minutos (300 seg). Se realiza un preentrenamiento durante 2-3 días antes del experimento y para ello se pone al animal sobre la rueda apagada durante 3 minutos para que este se acostumbre y así evitar que tenga ansiedad provocada por estar en un lugar desconocido. El día del experimento se coloca al animal sobre la rueda en funcionamiento y comienza el ciclo de aceleración, se deja al animal hasta 5 minutos y si no cae en este tiempo se le asigna la máxima puntuación que son 300segundos, si cae se anota el tiempo que ha estado sobre la rueda. Se establece el límite máximo en 300 seg. porque si lo dejáramos más tiempo, el animal caería pero no por descoordinación sino por cansancio. Se mide el tiempo que se mantiene el animal sobre la rueda en funcionamiento sin caer, este tiempo es indicador de la capacidad de coordinación motora del animal.

### **10.3 Test de comportamiento locomotor espontáneo**

El test de comportamiento locomotor espontáneo se realizó durante una hora para cada rata utilizando una caja de plástico transparente dividida en dos partes por una línea dibujada en su base. Las dimensiones de la caja son 40 cm de largo, 28 cm de ancho y 18 cm de alto. Se contaron cada 20 minutos durante una hora, los cruces y los alzamientos sobre las patas traseras. Se consideró como un cruce cada movimiento espontáneo de la rata que resultó en cambio de un lado de la caja al otro.

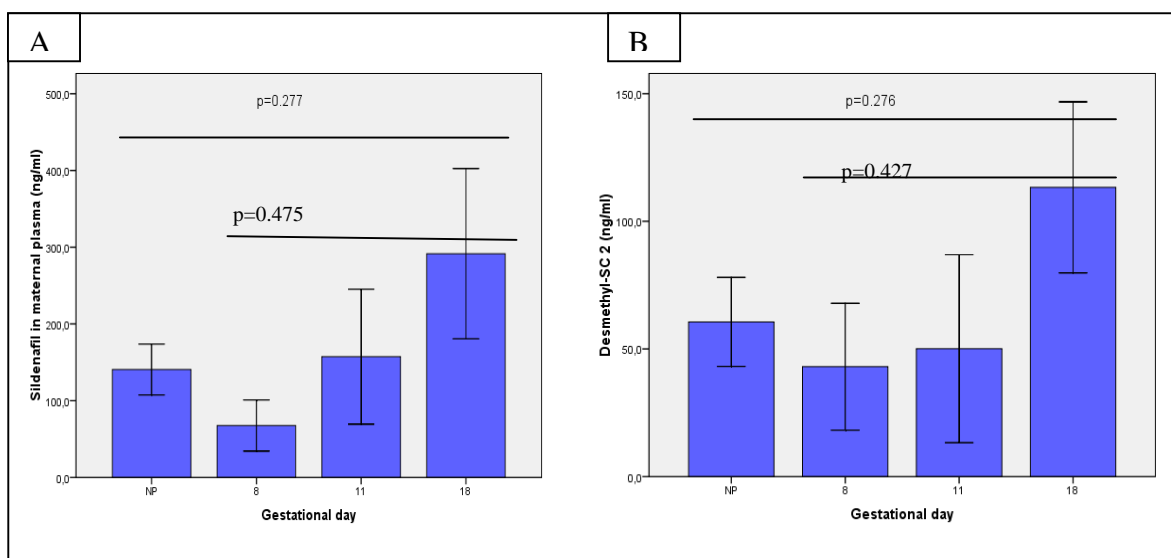
## **V.- RESULTADOS**

## V.- RESULTADOS.

### 1. Detección y cuantificación de la molécula de sildenafil en plasma e hígado materno y en hígado fetal a lo largo de la gestación.

#### 1.1 Cuantificación de SC y DM-SC en plasma materno a lo largo de la gestación:

Se observa tanto para SC como para DM-SC, en plasma materno a lo largo de la gestación, que no hay diferencias entre la concentración en los diferentes días, a pesar de esto, sí se detecta un incremento progresivo de las concentraciones según avanza la gestación (*Figura 1*), aunque no es estadísticamente significativo. (SC,  $p=0.475$ ; DM-SC,  $p=0.427$  respectivamente).

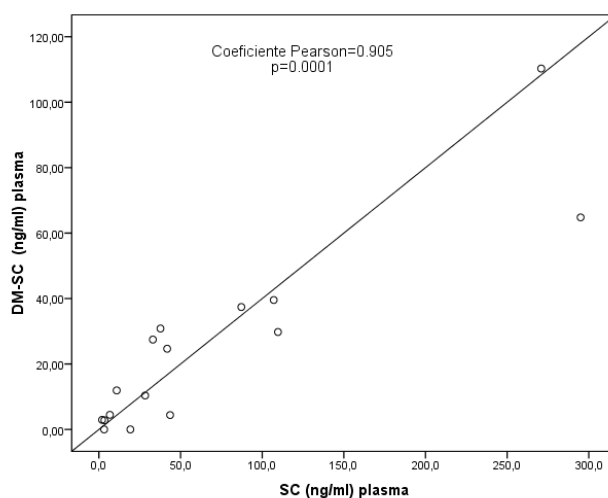


**Figura 1:** Evolución de la concentración de SC (A) y DM-SC(B) a lo largo de la gestación y en comparación con el grupo de no gestantes.

En el grupo de ratas no gestantes (SC-NoGEST) a las que se les administró el tratamiento durante un periodo similar a la gestación, tampoco se encontraron diferencias significativas en sus niveles de SC y DM-SC en los días medidos (SC,  $p=0.231$ ; DM-SC,  $p=0.182$ ).

Al comparar el grupo Gestante con el no gestante, no se detectaron diferencias (SC  $p=0.277$ ; DMS1  $p=0.276$  respectivamente, *Figura 1*).

Dentro del grupo gestante (SC) se determinó que existía una correlación lineal positiva entre la concentración de SC y la de DM-SC para cada muestra de plasma materno( *Figura 2*), siendo DM-SC el 29.1% del nivel de SC. Se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.905 entre SC y DM-SC1 ( $p=0.0001$ ) y C. Pearson= 0.894 para SC y DM-SC2( $p=0.0001$ ).



*Figura 2: correlación entre los niveles plasmáticos maternos de SC y DM-SC*

### **1.2 Cuantificación de SC y DM-SC en hígado materno y fetal.**

Se analizó la relación que existía entre los niveles de SC y DM-SC en hígado fetal con los maternos, mediante el análisis de regresión lineal (Pearson). (*Tabla 1*).

	Plasma No Gestantes	Plasma día 8	Plasma día 11	Plasma día 18	Hígado fetal E18.	Hígado materno.
Sildenafil ng/ml	46.85±11.06	16.13±12.83	52.45±29.30	97.17±36.98	162.55±11.36	467.54±33.14
DM-SC1 (ng/ml)	19.01±5.17	9.15±7.79	16.14±11.71	36.19±11.06	44.74±5.82	437.40±39.23
DM-SC2 (ng/ml)	20.19±5.80	9.56±9.56	16.70±12.27	37.76±11.16		

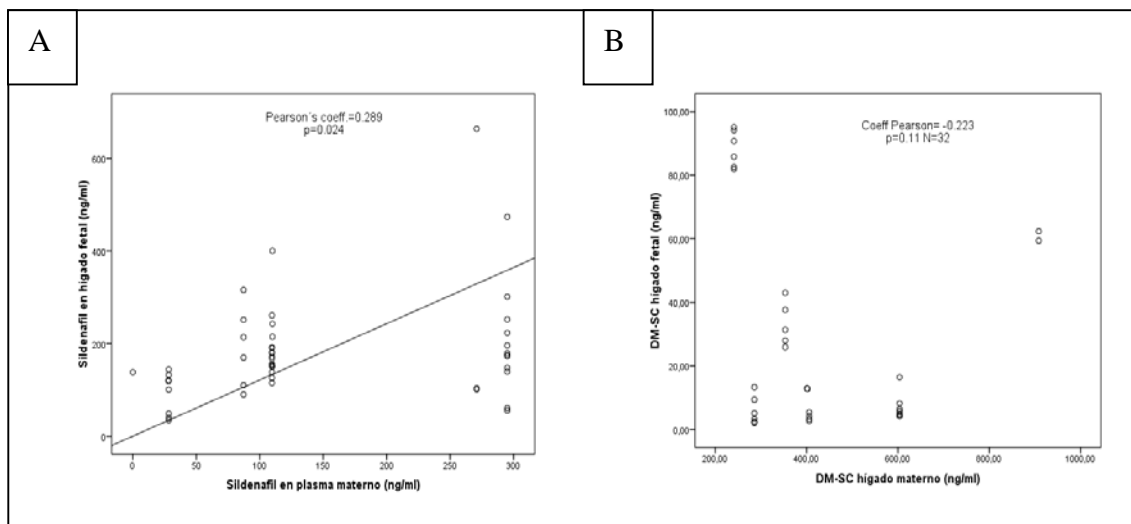
*Tabla 1: Concentraciones de SC y DM-SC en plasma de animales gestantes y no gestantes así como en hígado materno y fetal.*



Se determino que existía una correlación lineal positiva entre los niveles de SC en hígado fetal y los de plasma materno (Coef. Pearson=0.289 ;  $p<0.03$ )(Figura 3A). Para el DM-SC, no se obtuvo correlación entre los niveles plasmáticos maternos y los de hígado fetal ( $p=0.329$ ).

Tampoco he halló relación lineal entre los niveles en hígado materno y fetal de SC y DM-SC (SC,  $p=0.12$ , DM-SC  $p=0.11$ )(Figura 3B).

A diferencia de lo que ocurría en el plasma materno, en hígado fetal, la concentración de DM-SC no representa un valor constante de la de SC, aunque en la mayoría de casos analizados representa alrededor de un 25-30% ( $p=0.179$ ).



**Figura 3:** Relación entre los niveles maternos y fetales SC(A) y DM-SC(B).

## 2. Efectos sobre la tensión arterial y la hemodinámica maternas durante la gestación en los 4 grupos.

### 2.1 Tensión arterial materna y proteinuria.

En el grupo con PE, la proteinuria fue en todos los animales mayor de 0.3g/L, el resto de los grupos mostraron valores por debajo de 0.3g/L.( $p<0.05$ ). Los resultados del análisis se muestran en la tabla 2.

	CONTROL	PE	PE-SC	SC
Densidad	1.015	1.015	1.015	1.010
PH	6.8	6.8	6.25	6.75
Nitritos	10%(+)	36.4%(+)	-	-
Proteínas	<0.3g/l	80% 0.3-0.6g/l	<0.3g/l	<0.3g/l
Glucosa	-	50% (+)	-	-
Cetonas	4%(+)	36% (+)		-

**Tabla 2.** Resultados control proteinuria en orina durante la gestación.

A lo largo de la gestación se controló la tensión arterial de los animales, los valores obtenidos se muestran a continuación en la *tabla 3*.

TA (mmHg)	CONTROL			SC			PE			PE+SC		
Día gestación	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
0	118,22	3,189	3	115,49	5,49	2	118	5,771	4	131,2	3,988	4
7	121,17	3,919	14	106,75	1,748	21	133,75	3,508	13	125,4	3,339	8
11	114,79	2,089	15	98,82	3,667	12	146,47	2,7	15	118,15	5,464	4
17	132,01	6,599	6	118,89	6,372	5	163,67	9,068	8	145,03	8,589	5
No gestante	116,39	1,563	47	107,42	3,543	13	132,58	8,924	6	126,84	6,539	6

**Tabla 3:** Los valores de tensión arterial de los grupos de estudio a lo largo de la gestación y en los grupos no gestantes.

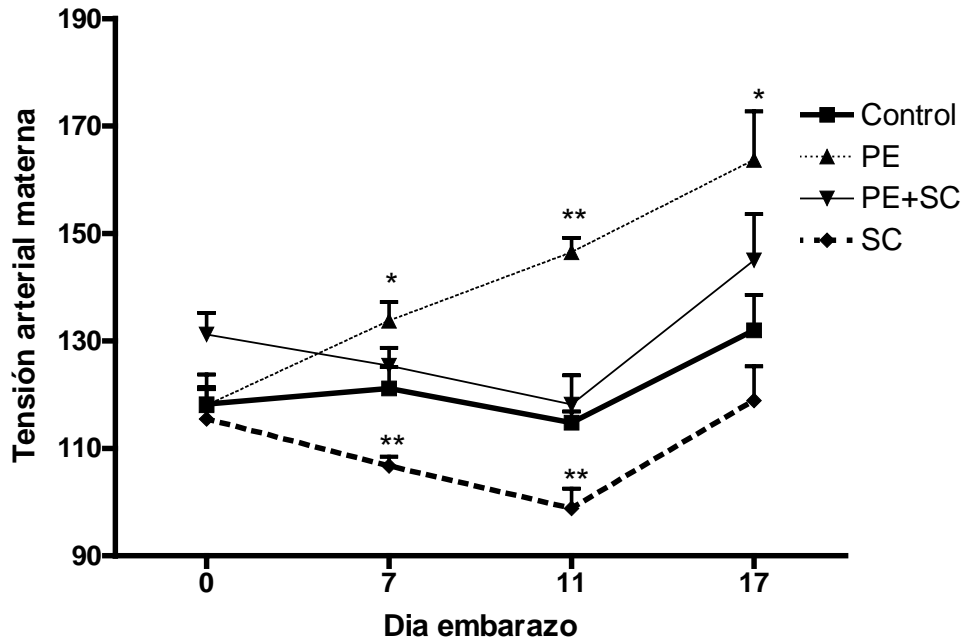
En el grupo CTRL. Gestante, encontramos que la tensión arterial materna (TAM) en E7, no varía respecto al grupo CTRL.-No GEST ( $p=0.74$ ). En día E11, sufre un descenso significativo respecto a su valor previo y en E17 asciende de forma significativa ( $p=0.016$  y  $p=0.003$  respectivamente).

En el grupo con PE vs. el control, hubo un ascenso significativo de la TAM en todos los días medidos E7, E11 y E17 ( $p=0.033$ ,  $p<0.0001$  y  $p=0.04$  respectivamente), (Figura 4).

En el grupo con PE, la administración continuada de sildenafil (PE+SC) mejoró los niveles de TAM no encontrándose valores significativos respecto al control ( $p=0.99$ ,  $p=0.99$  y  $p=0.99$  respectivamente).

La administración continuada de SC en la rata gestante, produjo un efecto hipotensivo selectivamente en los días E7 y E11 respecto a las ratas del grupo control( $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$  respectivamente).

En los grupos de ratas no gestantes que recibieron tratamiento, no se detectaron diferencias con el CTRL.-NoGEST, excepto en el grupo PE-NoGEST, donde se obtuvo una TAM mayor que en el control ( $p = 0.026$ ).



*Figura 4: Evolución de la TAM a lo largo de la gestación en los 4 grupos experimentales.*

## **2.2 Crecimiento intrauterino y postnatal.**

En el grupo de PE, obtuvimos valores de peso significativamente menores respecto del control en los fetos de día 8, 11, 18, en el primer día y a los siete días de nacer. ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  respectivamente).

La administración continuada de sildenafil durante el embarazo no consiguió revertir este efecto hasta el día 7 de nacimiento, por lo que se obtuvieron fetos de E8, E11, E18 y recién nacidos (PND1) más pequeños en este grupo ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.01$  respectivamente), (Figura 5).

La administración continuada de SC en ratas gestantes, produce un incremento significativo del peso respecto del control, este incremento aparece en E11 ( $p < 0.05$ ), E18 ( $p < 0.05$ ) y PND1 ( $p < 0.05$ ).

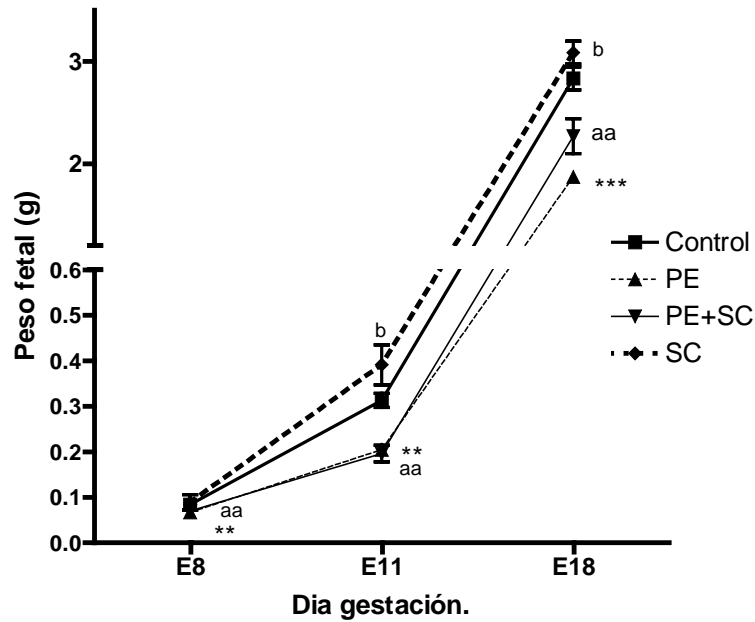


Figura 5: Evolución del peso fetal.

Todos los grupos obtuvieron pesos similares al control al alcanzar la etapa adulta (PND42). (Figura 6)

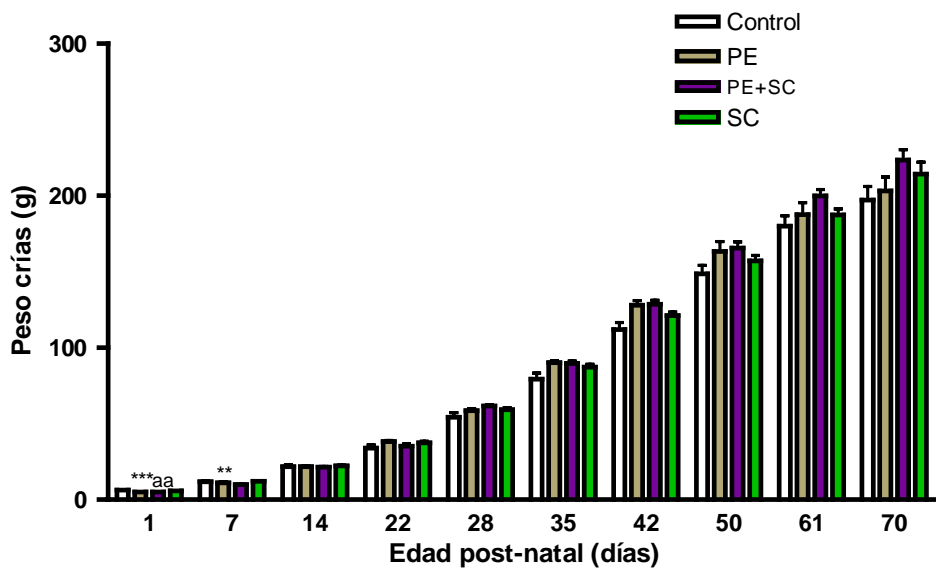


Figura 6: Evolución del peso de la descendencia hasta la edad adulta.

Si bien, los hallazgos descritos resultaron de la medición de los pesos, al realizar en E18 la medición del CRL para obtener datos de longitud intraútero, solo obtuvimos un incremento significativo de este en el grupo tratado con SC ( $p < 0.0001$ ).

### **2.3 Morbimortalidad perinatal**

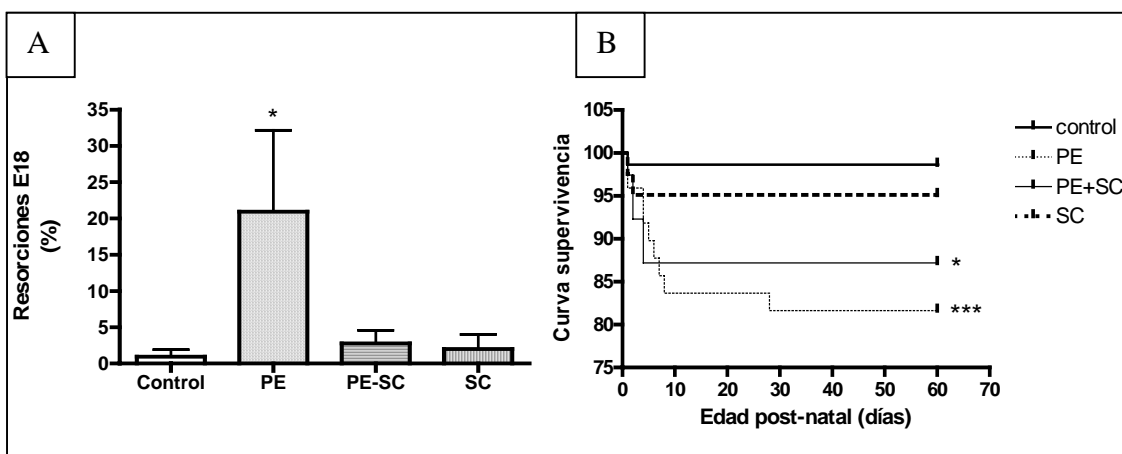
No hubieron diferencias significativas en el número de fetos ni en el tamaño de las camadas obtenidas en los cuatro grupos.

En el grupo de PE, obtuvimos un incremento significativo de mortalidad intraútero en medida en E18 ( $p < 0.05$ ). La administración de SC (*Figura 7A*).

Tras evaluar la tasa de supervivencia hasta los 2 meses de edad en los 4 grupos (*Figura 7B*), en el grupo de PE, observamos un descenso significativo, situando la tasa de supervivencia de las camadas en el 80% ( $p < 0.0001$ ).

La administración continuada de SC en el grupo de PE no consiguió recuperar los valores de normalidad, sin embargo se obtuvieron valores de supervivencia mayores que la situaron entorno al 87% ( $p < 0.05$ ). En ambos grupos, la mayoría de muertes se produjo durante los primeros 14 días de vida del animal.

No se obtuvieron diferencias significativas tras la administración continuada de SC.



**Figura 7:** Mortalidad intraútero (A) y curva de supervivencia de las camadas hasta la edad adulta (B).

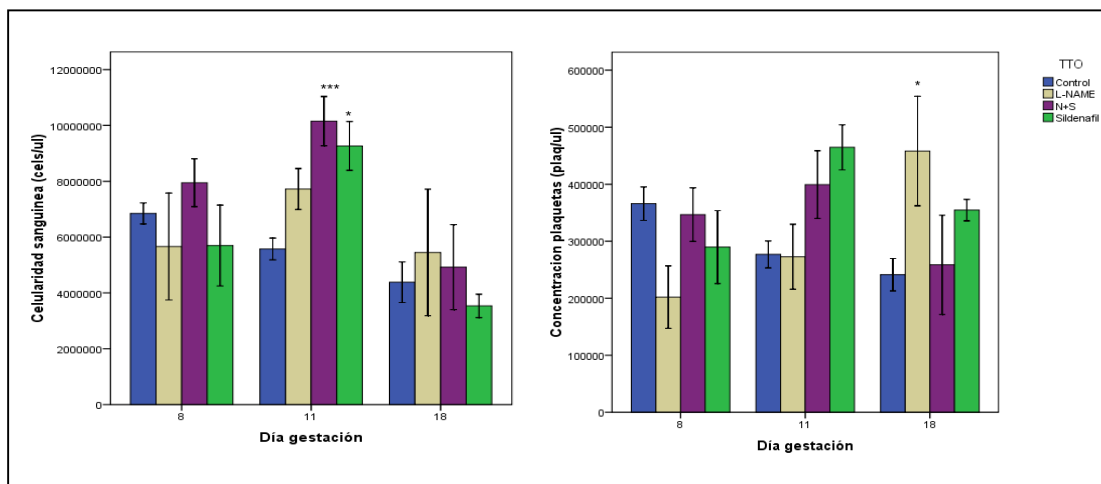
**2.4 Crecimiento placentario.**

El análisis macroscópico de los fetos no reveló cambios significativos en ninguno de los grupos.

Respecto a los pesos placentarios, en el grupo de PE existe un descenso aproximado del peso del 15% ( $p < 0.05$ ). Este efecto no se corrige al administrar SC. Si bien es cierto que la administración continuada de SC durante el embarazo, produce un incremento significativo del 10% del peso de la placenta ( $p < 0.05$ ).

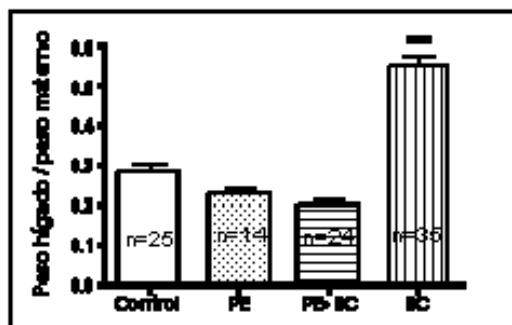
**2.5-Serie celular hematopoyética materna y peso del hígado fetal**

La viscosidad sanguínea en el grupo CTRL. Según avanza la gestación, se comporta de forma similar al embarazo humano, con un descenso progresivo (Figura 8). El grupo de PE presenta una celularidad menor en E8 y mayor en E11 que el grupo CTRL. Al administrar SC en el grupo de PE (PE+SC), en E8 y de forma significativa en E11 ( $p < 0.0001$ ) se obtuvieron valores de celularidad mas altos respecto del control. Parece ser un efecto a expensas de la administración de SC puesto que en el grupo de ratas gestantes tratadas con SC, se observo un incremento significativo en la celularidad en el día E11 ( $p = 0.016$ ). En cuanto a la concentración de plaquetas, vemos que en la gestación CTRL., la sangre se hemodiluye mientras que en el grupo PE funciona justo al revés, se hemoconcentra según avanza la gestación. Tanto el grupo PE+SC como el que solo recibe SC se comportan de forma similar, se mueven en valores cercanos al control excepto en E11 donde ambos sufren un incremento de la concentración de plaquetas, sin que este sea significativo.



*Figura 8: Evolución de la celularidad sanguínea y de la concentración de plaquetas durante la gestación.*

Por ser un órgano hematopoyético, analizamos los pesos de hígado fetal en E18 (*Figura 9*), no encontramos diferencias entre los grupos, excepto tras la administración continuada de SC, que produjo un incremento significativo ( $p < 0.0001$ ).



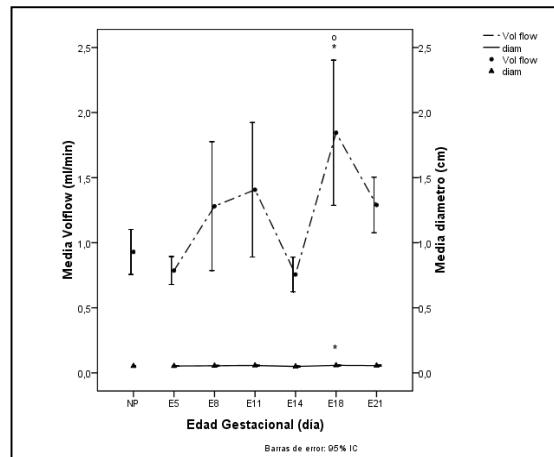
*Figura 9: Pesos fetales en día 18.*

## **2.6.-Parámetros hemodinámicos materno-fetales valorados con tecnología Doppler.**

### **2.6.1. Hemodinámica de las arterias uterinas maternas.**

En la gestación CTRL, el análisis cualitativo de las OVF de la arteria uterina obtenido de los días descritos, presentó en todo momento un patrón caracterizado por un flujo positivo durante todo el ciclo cardiaco con velocidades pico sistólicas elevadas. El flujo positivo diastólico resultó más evidente hacia el final de la gestación (E18) y el notch protodiastólico estuvo presente en todo momento.

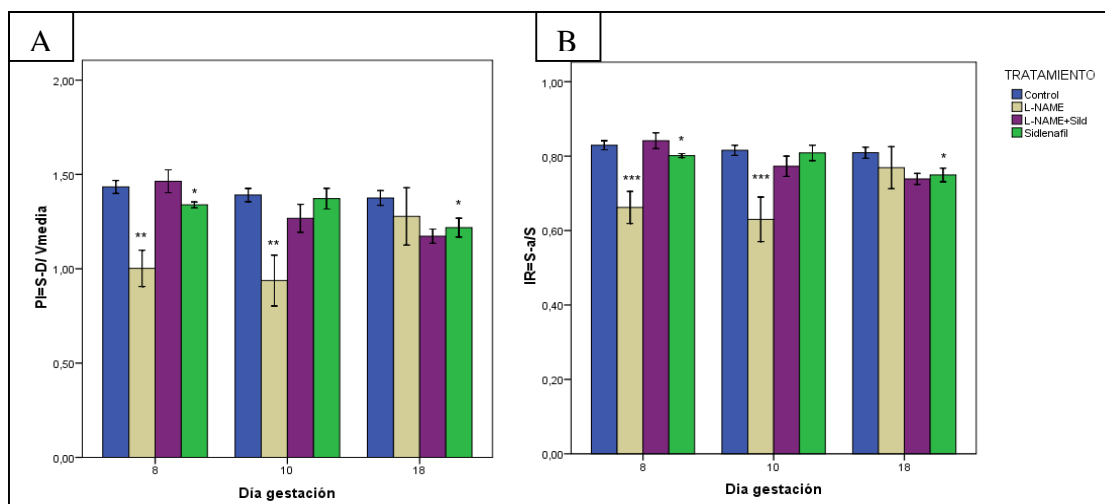
Por otra parte, los índices semicuantitativos vasculares de la rata gestante, se comportan de forma distinta al embarazo humano, ya que tanto el IR como el IP permanecen constantes a lo largo de la gestación y el diámetro del vaso no se modifica, a pesar de existir un aumento significativo del volumen de flujo al final en E18 ( $p < 0.05$ ), (*Figura 10*).



**Figura 10:** Relación entre el volumen de flujo y el diámetro de la arteria uterina a lo largo de la gestación normal.

En el grupo de PE, en contra de lo esperado, observamos un descenso significativo de ambos índices, IR e IP, tanto en E8 como en E11 (E8,  $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$  E8 y E11,  $p < 0.0001$  y  $p = 0.001$ , respectivamente). (Figura 11 A-B).

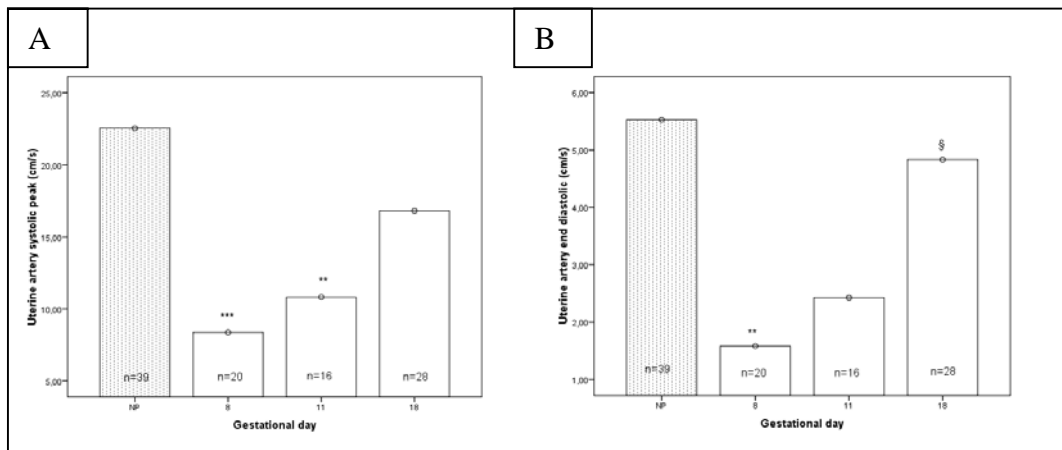
La administración de SC en el grupo de PE fue capaz de corregir este efecto, obteniendo valores de IR e IP no diferentes del grupo gestante de control, en todo momento.



**Figura 11:** Comportamiento de los índices vasculares de la arteria uterina en los 4 grupos experimentales a lo largo de la gestación.



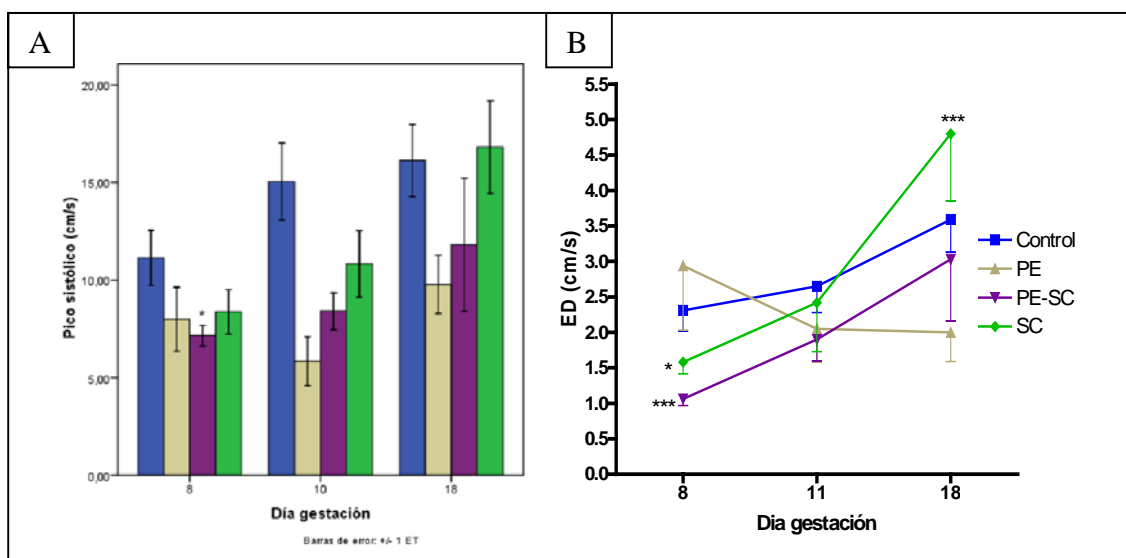
Sin embargo cuando administramos SC a la rata gestante, paradójicamente, también descendieron los índices en E8 (IP,  $p=0.015$ ; IR,  $p=0.043$ ) y en E18 (IP,  $p=0.014$ ; IR,  $p=0.013$ ). Este hallazgo junto al hecho de que en las ratas no gestantes, SC no modifica estos índices, nos llevó a pensar que se debe haber un efecto de SC en gestación inicial no presente en animales no gestantes (*Figura 12A-B*). Algo también coherente con los resultados observados en la TAM.



**Figura 12:** Efecto de la administración continuada de SC durante el embarazo sobre las velocidades pico de la arteria uterina en la rata gestante y en la no gestante.

Para una mejor comprensión de estos resultados pasamos a analizar por un lado las velocidades que componen estos índices y, por otro, posibles alteraciones en las OVF producidas por la frecuencia cardiaca materna.

En todos los grupos existe un incremento paulatino y significativo de ambas velocidades, sistólica y diastólica conforme la gestación avanza, excepto en el grupo con preeclampsia (*Figura 13 A-B*). En este grupo la velocidad sistólica desciende en E11 para volver a ascender en E18, aunque estos cambios no son significativos. Por el contrario, la diastólica tiende a disminuir según avanza el embarazo.



**Figura 13:** Evolución de las velocidades pico de la arteria uterina en la rata gestante de los 4 grupos experimentales.

A lo largo de la gestación CTRL, la frecuencia cardíaca materna, asciende ligeramente en E11 para descender en E18 ( $p < 0.0001$ ).

El grupo de PE, la frecuencia asciende significativamente en E11 ( $p = 0.003$ ) para descender después en E18 ( $p = 0.026$ ).

Al administrar sildenafil, (PE+SC) este efecto se corrige y no existen diferencias entre la frecuencia cardíaca a lo largo del embarazo, aunque el patrón de ascenso en E11 y descenso en E18 que se observa en la gestación control se repite. Este efecto parece ser consecuencia de la administración de sildenafil, ya que el grupo tratado con SC no muestra diferencias significativas a lo largo de la gestación.

Si comparamos la FC de los animales tratados respecto al control, encontramos que los 3 grupos tienen la FC significativamente menor en E8 ( $p < 0.0001$ ) y E11 ( $p < 0.0001$ ) que en CTRL, no existiendo estas en E18.

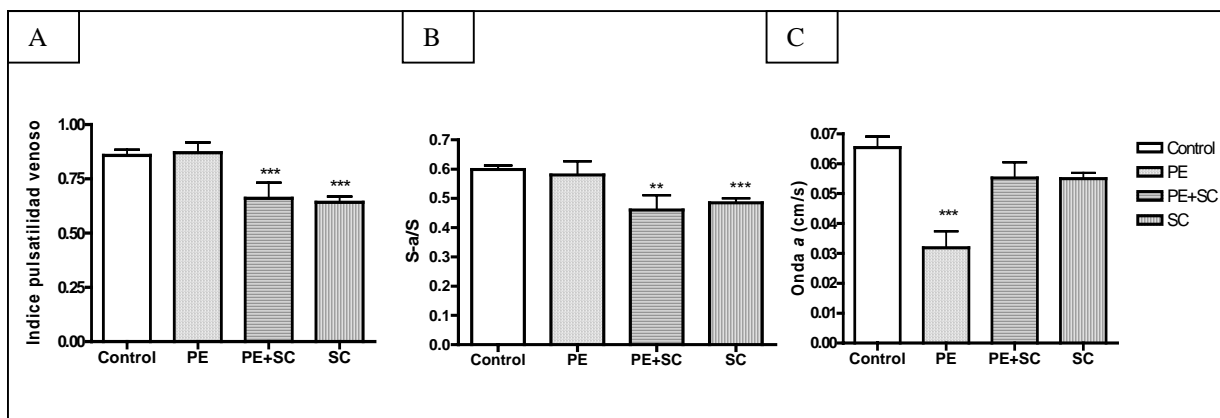
### 2.6.2 Hemodinámica del Ductus venoso fetal.

En los fetos de día 18 analizamos en comportamiento hemodinámico en el ductus venoso.

En el grupo de PE, mantuvo unos niveles similares al control, sin embargo, tras la administración continuada de SC si que se observó una disminución de los índices de

pulsatilidad del vaso. Si bien es cierto que este mismo resultado lo presentaba el grupo de gestantes en tratamiento con SC (*Figura 14 A-B*).

Al evaluar individualmente el valor de la onda a, en el grupo PE se obtuvo un descenso significativo de su valor ( $p < 0.0001$ ), (*Figura 14C*). Tras la administración de SC, se corrigió este descenso, no obteniendo diferencias respecto al control.



*Figura 14: Comportamiento de los índices venosos en el DV fetal y de la velocidad End diastólica en los fetos de los 4 grupos.*

En cuanto a la frecuencia cardiaca fetal, se observó un incremento significativo de esta en el grupo de PE ( $p=0.04$ ). No se detectaron cambios en el resto de grupos.

### 3.- SNC Post-natal. Desarrollo neurológico de la descendencia.

Para la valoración de los posibles efectos de los tratamientos sobre el desarrollo neurológico de las crías, se dejó que estas llegaran a una edad de 2-3 meses. En este momento se seleccionó a 8-10 machos de cada tratamiento para llevar a cabo este estudio.

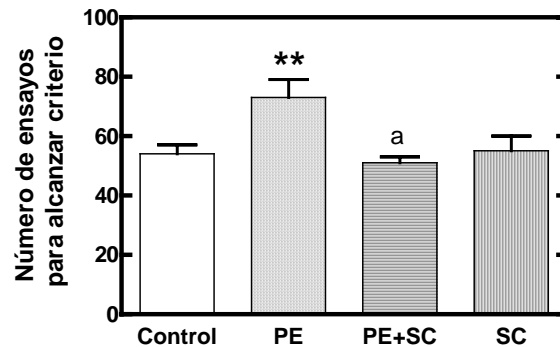
#### 3.1. Test de aprendizaje de discriminación condicional en el laberinto en Y.

El test evalúa el número de ensayos que necesita cada animal para aprender a asociar un color con en lado del laberinto en el que se encuentra la comida.

Como se observa en la *Figura 15*, las crías con PE necesitaron más ensayos ( $p=0.008$ ) que las control para aprender la tarea, indicando que tienen disminuida su capacidad de aprendizaje.

Este efecto desaparecía en el grupo PE+SC, que presentaba un valor similar al control y presentaba diferencias significativas respecto al grupo PE ( $p=0.004$ ). El grupo SC no muestra diferencias ni con el control ni con el PE+SC en la capacidad de aprendizaje.

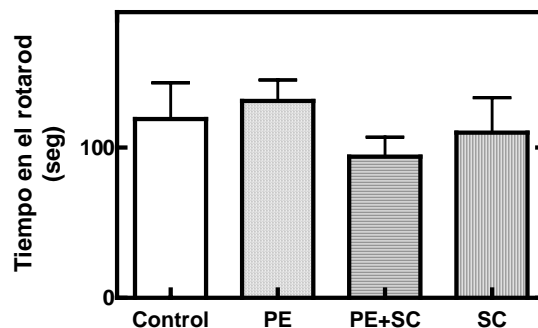
Esto indica que el sildenafil restaura la capacidad de aprendizaje en ratas con PE.



*Figura 15: Evaluación de la capacidad de aprendizaje de las camadas a los 2 meses de edad.*

### 3.2. Test de coordinación motora ROTAROD.

Al comparar el tiempo que permanecían los animales en sobre una plataforma giratoria en aceleración, no se obtuvieron diferencias en ninguno de los tratamientos, es decir, en ninguno de los tratamientos se altera la coordinación motora respecto al control (*Figura 16*).



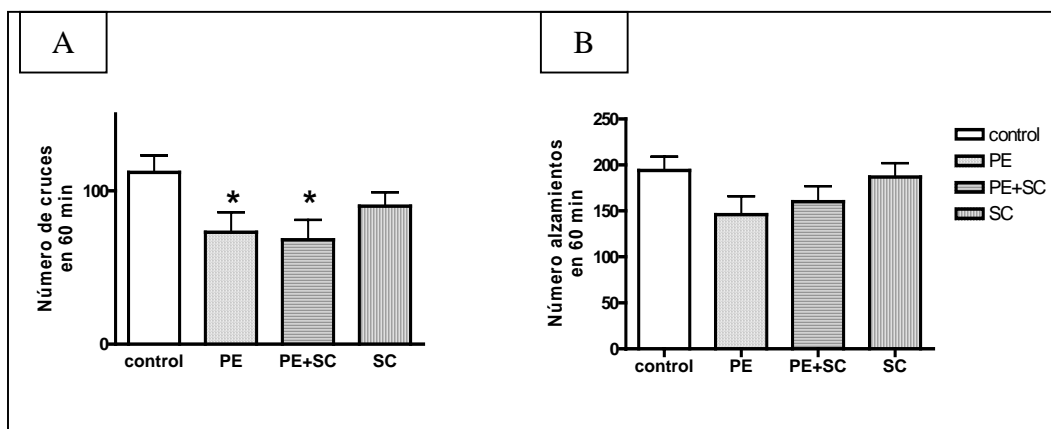
*Figura 16: Valoración de la capacidad de aprendizaje de las camadas a los 2 meses de edad.*

### 3.3 Test de comportamiento locomotor espontáneo.

En el test de actividad locomotora espontánea se valoraron dos parámetros diferentes, la actividad motora horizontal (cruces) y la vertical (alzamientos) (*Figura 17*).

Se observaron diferencias significativas en la actividad motora horizontal ya que tanto el grupo PE ( $p=0.038$ ) como el PE+SC ( $p=0.029$ ) realizaron menos cruces que el control, mientras que el grupo tratado con SC no mostró diferencias.

En cuanto a la actividad vertical, no hubo diferencias entre los grupos.



*Figura 17: Evolución del comportamiento motor de la descendencia.*

## VI.- DISCUSIÓN

## VI. DISCUSIÓN.

Hasta donde sabemos nuestro trabajo muestra, por primera vez, los efectos de la administración continuada de Sildenafil desde el comienzo del embarazo en un modelo animal de preeclampsia. Este es el objetivo fundamental planteado al inicio del trabajo. Esto junto con los resultados obtenidos de objetivos secundarios, nos han llevado a estructurar la discusión en tres apartados independientes para una mayor comprensión del lector.

### 3.1 Evaluación del modelo animal de preeclampsia.

Estudios anteriores realizados con L-NAME en ratas gestantes mostraron que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico tenía un efecto hipertensivo durante el segundo y tercer trimestre del embarazo (Nathan *et al.*, 1995) pero no se pudo demostrar durante el primer trimestre. Nosotros, sin embargo, hemos encontrado un aumento significativo desde el inicio de la gestación y con un patrón similar al grupo control de embarazo. Una explicación sería que se realizaron en un momento de la gestación (E9-E11) que supone un estado de transición entre el primer y segundo trimestre en el cual ya puede haberse producido el hiperflujo vascular del inicio del embarazo. Trabajos posteriores también han demostrado que la inhibición de la síntesis de ON desde la primera mitad de la gestación aumenta significativamente la tensión, de acuerdo con nuestros resultados. (Fernández-Celadilla *et al.*, 2005; Pallarés *et al.*, 2008; Ramesar *et al.*, 2009).

Los efectos del grupo tratado con L\_ NAME fueron los esperados para el modelo.

La mayoría de trabajos realizados en animales sobre la PE, centra su atención en el estudio de los parámetros durante el embarazo, sin aportar información sobre la evolución de las camadas (Fernández-Celadilla *et al.*, 2005; Pallarés *et al.*, 2008). En este sentido, el seguimiento de las crías nacidas del modelo animal de PE, muestra un retraso del crecimiento, presente en toda la vida fetal, que se mantiene hasta las primeras semanas de vida. Presentan una tasa de supervivencia disminuida (entorno al 80%) con unas tasas de mortalidad significativas. Destacando que la mortalidad está presente durante los primeros días tras el nacimiento, lo cual se asocia, desde el punto de vista clínico, con un evento hipóxico prenatal (Bell *et al.*, 2005).

Es importante destacar que las crías no desarrollaron hipertensión durante la vida adulta, por lo que podemos deducir que los efectos del modelo sobre la tensión, cesaron al finalizar la administración del inhibidor de NOS, justo tras el parto.

Además en referencia al seguimiento dichas crías, hemos de añadir que al estudiar el desarrollo neurológico en la edad adulta, se observó que existe una deficiencia en la capacidad de aprendizaje, así como una disminución en el comportamiento motor espontáneo mientras que la coordinación motora no se vio afectada. Estos resultados viene respaldados por estudios que asocian la existencia de hipertensión materna, con deficiencias en el desarrollo de las grandes capacidades motoras (Ounsted *et al.*, 1980). Otros estudios animales más recientes han asociado déficit cognitivos tardíos como problemas del lenguaje y aprendizaje, disminución de la capacidad de orientación e hiperactividad, con eventos hipoxicos intraútero como la PE. (González *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2004 ; Many *et al.*, 2003; Strijbis *et al.*, 2006).



En humanos, los trabajos que describen los efectos en la descendencia de mujeres con PE, encuentran numerosos efectos en el desarrollo hacia la vida adulta. Esta descrito un incremento de la mortalidad perinatal, retraso del crecimiento, afectación del desarrollo neurológico y alteraciones del metabolismo lipídico (Sibai *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2006). La visión global de los resultados expuestos muestra un modelo animal que reproduce en su mayoría los efectos descritos para la PE en humanos.

En la actualidad, no existe ninguna prueba con suficiente sensibilidad para realizar un cribado eficaz de preeclampsia en humanos, sin embargo, el estudio de la circulación uterina entre la semana 20<sup>a</sup> y 24<sup>a</sup>, puede llegar a serlo. (Sibai *et al.*, 2009), Esto unido al hecho de que , SC, posee un efecto directo sobre los vaso, hace que analicemos en detalle la función uterina .

En conjunto, los resultados hemodinámicas de nuestro modelo muestran que los fetos se encuentran en una situación de flujo vascular comprometido al final de la gestación, tal y como ocurre en la preeclampsia.

Para poder valorar el comportamiento hemodinámico de la rata gestante hay que tener en cuenta que es diferente del humano. Así en estos animales observamos que la gestación supone, desde el comienzo, una disminución importante de las velocidades pico en los vasos uterinos, tal como pasa en humanos, pero mantiene unos índices de pulsatilidad y resistencia constantes. El hecho de tener que mantener una media de 10-12 embriones en crecimiento, con unas frecuencias cardíacas 4 veces superiores a las humanas, es probablemente, la explicaron más coherente. Otros grupos han descrito que los índices en pequeños animales similares como el ratón, también poseen valores mantenidos en vasos periféricos (Geusens *et al.*, 2008; Verlohren *et al.*, 2008)

En un modelo animal de PE es esperable que tanto el IP como el IR se encuentren elevados desde el inicio del embarazo, acompañando a la hipertensión materna. Pero los resultados muestran un patrón diferente con unos índices vasculares bajos en los dos primeros trimestres. Nuestra hipótesis es que L-NAME posee un efecto selectivo en la placenta que produciría una mayor velocidad sanguínea. Para poder explicarlo hemos de analizar las velocidades pico de forma individualizada, ya que vemos que el grupo L-NAME parte de una velocidad diastólica más alta que el control en primer trimestre y luego desciende progresivamente, a la inversa que en humanos y que en el grupo de las ratas control.

Si observamos el diámetro del vaso vemos que L-NAME tiene un efecto constrictor sobre la arteria uterina en la primera mitad del embarazo y además se acompaña de una disminución de la viscosidad sanguínea al administrarlo. Ambos factores tienen como resultado la elevación del componente diastólico de la OVF en un vaso y por tanto, pueden ser la causa de la disminución de los índices. Además existe una alteración de la frecuencia cardiaca que unido a una variación de la viscosidad, deben ser considerados.

Lo que sí es evidente de la evaluación hemodinámica del modelo, es que los fetos de 18 días poseen una onda atrial de DV significativamente menor que el grupo control. Esto significa que la cantidad de sangre que llega al corazón fetal desde la placenta, está disminuida. En los fetos de las pacientes con PE severa la vigilancia del descenso de estos índices venosos es el marcador clínico usado hoy en día para vigilar el estado hipóxico de los fetos y para su extracción inmediata del ambiente uterino(Sibai *et al.*, 2009) Nuestros embriones del final del embarazo se encuentran sometidos a un estado hipóxico crónico que parece tener relación con los valores antropométricos obtenidos.

Todo lo visto, en conjunto, sustenta la idea de que con el desarrollo de este modelo animal, estamos produciendo el efecto deseado actuando con un evento hipóxico desde el inicio del proceso de placentación.

### **3.2 Efectos de Sildenafil sobre la gestación normal.**

El primer inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5), el sildenafil, ha evolucionado en menos de 20 años de ser un medicamento con uso potencial antianginoso, a ser un medicamento oral de gran demanda para la disfunción eréctil y más recientemente para el tratamiento de la hipertensión pulmonar (Baquero *et al.*, 2006; Jaillard *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de que la molécula de sildenafil ha sido ampliamente utilizada en modelos animales para el estudio de sus propiedades farmacológicas, poco se conoce acerca de su metabolismo durante el proceso de gestación. (Walker *et al.*, 1999)

Hemos administrado SC desde el inicio de la gestación, a una dosis ya testada anteriormente por nuestro grupo, de 4mg/Kg (Erceg *et al.*, 2005, Gómez-Pinedo *et al.*, 2009; Caulí *et al.*, 2010). Los estudios que lo han utilizado en animales gestantes, lo administran sobretodo, durante la segunda mitad del embarazo y las dosis utilizadas, oscilan entre los 3 y los 200mg/Kg. Además, a pesar de que todos han evaluado los posibles efectos fetales derivados de la administración de sildenafil, ninguno ha determinado si realmente el sildenafil llega al feto. (Refuerzo *et al.*, 2006; Zoma *et al.*, 2001; Abbot *et al.*, 2004; Belik *et al.*, 2005; Sasser *et al.*, 2010)

Hemos detectado la presencia de SC en el hígado del feto, lo que demuestra su paso transplacentario. Los niveles en tejido fetal mantienen una relación con los valores

plasmáticos maternos al final de la gestación. La correlación positiva obtenida, sirve para poder establecer una dosis efectiva en caso de que la molécula, cumpla las expectativas planteadas para su uso tanto terapéutico como profiláctico. También se ha determinado los niveles del metabolito DM-SC en plasma de rata gestante, así como su relación con los niveles que llegan al feto. El comportamiento resulta similar al de SC, salvo un valor proporcionalmente menor del DM-SC en el hígado fetal. Una posible explicación para ello sería una inmadurez enzimática del hígado.

La dosis elegida ha sido testada como efectiva por nuestro grupo y como hemos visto en los resultados, no existen variaciones en la concentración de SC y DM-SC en los momentos estudiados de la gestación. Tampoco se han encontrado en el grupo de animales no gestante, que recibían la misma pauta y duración. Por tanto, tanto las estructuras que se desarrollan durante la gestación, como el aumento del volumen de distribución no actúan de reservorio para la molécula, al administrarla de forma continuada. En este sentido, las pautas de administración de los inhibidores de la PDE5 están cambiando, y han pasado de una administración aguda de dosis elevadas a una administración diaria de dosis bajas (Fusco *et al.*, 2010).

Una vez establecida la forma de administración, queda por establecer los efectos que SC tiene en la gestación normal.

Hemos visto un incremento del peso fetal a lo largo de todo su desarrollo, que se mantiene hasta el nacimiento. Sin embargo en la edad adulta, los animales no muestran diferencias en el peso. Este efecto ha sido descrito, entre otros grupos, por Sánchez-Aparicio *et al.* 2008, en un estudio realizado en conejillo de indias para mejorar la adaptabilidad neonatal tras administrar el sildenafil al final de la gestación.

Otro hallazgo significativo es que la administración continuada de sildenafil durante el embarazo produce un incremento del peso del hígado fetal y de la placenta.

Por un lado, la hipertrofia hepática no es algo nuevo y es un efecto especie-específico descrito previamente en la literatura. Parece tener su origen en la inducción del enzima hepático UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT) que conlleva a una hipertrofia hepatocelular adaptativa (Abbot *et al.*, 2004; Villanueva-García *et al.*, 2007).

Por otro lado, respecto al incremento de las placentas no existen datos previos. Podría corresponder con un efecto similar al del hígado, puesto que se sabe que el enzima UDPGT está presente en la placenta de la rata (Lucier *et al.*, 1977). Otra explicación posible es que fuese el resultado de un estímulo angiogénico placentario, acorde con recientes investigaciones sobre este tema (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2008). Apoyando esta hipótesis, observamos que hemodinámicamente, SC consigue aportar al feto un flujo sanguíneo mayor desde mitad de la gestación. Por ello parece plausible que la administración continuada de sildenafil durante el embarazo induzca el crecimiento de la placenta.

La tasa de mortalidad intraútero no se vio incrementada por la administración de SC, acorde con estudios publicados que resaltan una seguridad en su administración (Villanueva-García *et al.*, 2007; Refuerzo *et al.*, 2006). Las dosis empleadas están muy por debajo de lo testado en los estudios neonatales y por debajo de las dosis utilizadas en el único estudio publicado sobre gestantes con preeclampsia (Samanagaya *et al.*, 2009)

Nuestros resultados al evaluar el efecto de SC sobre el desarrollo neurológico de la descendencia, no mostraron ningún efecto adverso sobre la capacidad de aprendizaje, la coordinación ni la actividad motora espontánea (Caulí *et al.*, 2010). Además, nuestro grupo ha demostrado que el incremento del cGMP en el cerebro fetal, como consecuencia de la administración de SC en la gestación, promueve la diferenciación a

neuronas de las células madre del cerebro (Gómez-Pinedo *et al.*, 2009). Por ello, SC puede mejorar las alteraciones de la neurogénesis descritas en casos de PE.

Esto, junto con el hecho de que la tasa de mortalidad perinatal no era diferente de la del grupo control, nos hace pensar que, en principio, la dosis de SC utilizada, la vía y el tiempo de administración son seguros.

Uno de los hallazgos más relevantes del trabajo ha sido la observación de que, si bien el Sildenafil no afecta la tensión arterial de animales no gestantes, si que muestra “*per se*” un efecto hipotensor selectivo en la primera mitad del embarazo, sin cambiar las resistencias periféricas maternas. Este efecto, parece ser debido a la vasodilatación, como mas adelante veremos..

El sildenafil produce vasodilatación por el aumento de GMPc secundario a la inhibición de la fosfodiesterasa que lo degrada a GMP . Este efecto vasodilatador ya ha sido descrito en ratas (Momma *et al.*, 1992) y ovejas (Jaillard *et al.*, 2006), en las que SC actúa disminuyendo las resistencias del territorio pulmonar al producir un incremento del flujo, pero sin modificar los grandes vasos como la aorta. Es también un estimulador muy potente del factor angiogénico, induciendo respuesta angiogénica en las células endoteliales de las arterias coronarias humanas a través de la expresión de tioredoxina, hemoxigenasa y el factor vascular endotelial de crecimiento (Vidavalur *et al.*, 2006).

Hasta ahora no se había estudiado su efecto en gestantes vs. no gestantes y ello ha llevado a realizar un trabajo más exhaustivo del inicialmente propuesto en este sentido. Los resultados muestran que en el grupo no gestante, la administración continuada de SC no modifica ni la tensión arterial ni los índices vasculares en las

arterias uterinas. Por tanto los efectos observados, solo están presentes si existe embarazo. Existen dos posibles hipótesis para este efecto embarazo-dependiente, en la primera se relaciona el efecto de producido por sildenafil con la situación hormonal que conlleva el embarazo, ya que se ha visto que SC no tiene efecto sobre ratas ovariectomizadas (Zoma *et al.*, 2001 ). La segunda hipótesis, sería que el efecto del sildenafil dependa del proceso de inicial de placentación y de los niveles de GMPc, ya que se ha descrito un incremento de su concentración en mujeres gestantes de primer trimestre (Conrad *et al.*, 1999).

Al analizar la función hemodinámica fetal mediante el análisis del DV, observamos que el SC produce un efecto vasodilatador sobre este “*shunt*” fetal. A la vista de lo descrito anteriormente, cabe esperar que el potencial angiogénico del Sildenafil desencadene un proceso angiogénico más amplio en primer trimestre, que sea responsable del hiperflujo fetal, presente al final de la gestación.

### **3.3 Efectos del sildenafil sobre la gestación patológica.**

Como se ha descrito en la introducción, la molécula de sildenafil, posee unas características que la hacen atractiva para el tratamiento de pacientes gestantes con preeclampsia. Y existe un interés en analizar su efecto en gestaciones patológicas en animales y recientemente por primera vez, también en humanos (Samanagaya *et al.*, 2009). Pero hay que puntualizar, que los modelos experimentales en animales se han diseñado hasta hace poco, con una administración en la segunda mitad de la gestación y con un objetivo terapéutico sobre una enfermedad con un debut clínico tardío (Villanueva-García *et al.*, 2007).

Hemos iniciado una administración más temprana de la sustancia, con la intención de actuar sobre el desarrollo de la placentación. Según lo expuesto y según la hipótesis planteada, esto supondría actuar de manera preventiva sobre los efectos vistos en el modelo animal de preeclampsia.

Los valores elevados de tensión arterial y proteinuria maternos, así como los parámetros hemodinámicos uterinos, se corrigen desde la primera determinación.

El efecto sobre la tensión materna puede explicarse porque como hemos visto, SC produce un efecto hipotensor selectivo en el la primera mitad del embarazo en la rata gestante.

En nuestro modelo, la administración concomitante del L-NAME y SC puede enmascarar si en realidad SC evita la instauración de la PE o en su defecto la cura. Un estudio reciente similar al nuestro, inicia la administración de SC desde día 7 de embarazo y mide la tensión materna sólo en dos momentos, día 0 y 20 de gestación. Igual que nosotros logra disminuir los valores tensionales y la proteinuria en el grupo de L-NAME tratado con SC, aunque no logra niveles de normalidad como los nuestros. Lo que si consigue este estudio de administración algo mas tardía que la nuestra, es mejorar el peso fetal y de la placenta (Ramesar *et al.* 2010). Tanto el peso fetal como el placentario son representativos de la función vascular (Kaufmann *et al.*, 2000).

Acorde con lo que acabamos de postular sobre un efecto en el desarrollo vascular placentario del inicio de la gestación, encontramos valores diastólicos en el territorio uterino materno, cada vez más crecientes en los tres trimestres, al revés de lo que ocurre en las madres con PE. Esto representa un incremento del flujo del territorio placentario gradual y paralelo al que se produce en la gestación normal.

En contra de nuestra hipótesis, existen dos trabajos a destacar publicados recientemente. El primero es un experimento realizado en ovejas sobre un modelo de RCIU, que



mostró que la administración aguda y tardía producía acidosis y fallo cardiaco en los fetos, así como una disminución del flujo uterino. Sin embargo, el modelo reducía drásticamente el flujo placentario resecaando la placenta quirúrgicamente y luego daba de forma aguda, dosis altas de SC. Sobre un territorio isquémico agudo, la reperfusión se convierte en un mecanismo muy dañino por los radicales libres, tal como ocurre tras los infartos agudos en áreas de corazón o cerebro (Miller *et al.*, 2009).

El segundo es el único estudio randomizado llevado a cabo en gestantes con PE, que no mostró una clara mejoría sobre los fetos. Sin embargo, no todos los casos seleccionados, presentaban un claro compromiso fetal (algunos tenían valores de PI por debajo del percentil 50). (Samangaya *et al.*, 2009).

Por otra parte, nuestros fetos en hipoxia mejoran significativamente los parámetros que usamos habitualmente para valorar su estado acidótico, es decir el IPV del DV. Esto demuestra una recuperación en la cantidad de sangre que llega al corazón del feto desde la placenta en el momento con mayor elevación de las resistencias vasculares en el territorio materno.

Respecto al efecto de SC sobre el resultado perinatal en el modelo de PE, vemos no ha sido capaz de recuperar el peso fetal, sin embargo la descendencia muestra una ganancia ponderal acelerada que normaliza su peso en la primera semana de vida, lo que representa una recuperación mucho más rápida que los animales nacidos de madres con PE. Dosis superiores han demostrado la recuperación del peso de los fetos ya intraútero y en el periodo neonatal (Ramesar *et al.*, 2010). Por tanto nos planteamos que tal vez hemos utilizado una dosis baja de SC, de hecho, la menor testada hasta ahora. Al igual que el peso de los fetos no llega a corregirse hasta después del nacimiento, tampoco la placenta mejora su peso total respecto a la de animales sometidos a PE. Pero

como hemos visto el SC administrado durante la gestación normal si que ejerce un efecto hipertrófico sobre ella.

Otro hallazgo importante de su efecto sobre los fetos, es que el SC reduce significativamente la tasa de muerte intrauterina producida en el modelo de PE. En este sentido, la seguridad de la droga es ampliamente aceptada en el uso clínico de la sintomatología neonatal asociada a la hipertensión pulmonar y además, se persigue su incorporación más temprana para mejorar la adaptabilidad al nacimiento.(Vargas-Origel *et al.*,2010) Estudios en animales así lo demuestran (Sánchez –Aparicio *et al.*, 2008). También mejora las tasas de supervivencia hasta la edad adulta

Lo más destacable acerca del desarrollo neurológico, es la recuperación de las capacidades de aprendizaje que estaban disminuidas en el modelo de PE.

Tal como hemos dicho estimula la neurogénesis, lo que también ocurre en el modelo de PE, devolviendo sus valores a la normalidad. (Erceg *et al.*, 2005; Gómez-Pinedo *et al.*, 2009)

En este sentido, los neonatos sometidos a insuficiencia placentaria, tienen un volumen de la corteza cerebral disminuido a expensas de las neuronas del hipocampo, lo cual se ha relacionado con una mayor prevalencia de déficits cognitivos y de memoria en estos niños por una pérdida axonal ( Lodygensky *et al.*, 2008). También se ha visto un retraso en la maduración de la cápsula interna con un mayor desarrollo y mielinización de la sustancia blanca. Hay una disminución de la anisotropía de la sustancia blanca del cuerpo calloso (o pérdida neta de las barreras de restricción del movimiento de moléculas de agua) (Huppi *et al.*, 2004).

En resumen , nuestros resultados abogan más por una administración continuada de la molécula y desde el inicio, momento en el que parece producirse el problema de

invasión que finalmente dará lugar a la aparición de los síntomas del cuadro clínico materno característico de la preeclampsia. A pesar de estos esperanzadores resultados, algunos de los parámetros fetales que hemos evaluado, como el crecimiento intrauterino, siguen sin recuperarse. Dos cuestiones se plantean para el futuro cuando se autorice su uso clínico, por un lado la posibilidad del uso de droga como un fármaco preventivo en casos de antecedente de insuficiencia placentaria y otra establecer y plantear una administración tardía pero continua en los casos que debutan de forma severa en el segundo trimestre.

## VII.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Las conclusiones extraídas de este trabajo son:

- El modelo presentado de preeclampsia animal mediante inhibición crónica del Oxido Nítrico, reproduce condiciones hemodinámicas maternas y una situación hipóxica en el feto, que hacen útil su uso en la investigación terapéutica de la enfermedad.
- La molécula de Sildenafil y su metabolito tras ser administradas en ratas gestantes, están presentes en el hígado fetal y guardan relación lineal con los valores maternos.
- Sildenafil ejerce un efecto hipotensor selectivo en el inicio de la gestación, al compararlo con animales no gestantes, sin modificar las resistencias periféricas de las arterias uterinas maternas.
- La administración temprana y de forma continuada de SC durante el embarazo, revierte los efectos que L-NAME produce en el modelo animal de PE recuperando completamente el cuadro clínico materno y la función hemodinámica y consiguiendo un flujo sanguíneo fetal normal al final de la gestación..
- El modelo de PE animal produce alteraciones en el desarrollo del cerebro fetal que se expresan a través de la alteración de la capacidad de aprendizaje y de la actividad motora, la administración de SC corrige dichas alteraciones.

## **VIII.- BIBLIOGRAFÍA**

**VIII: BIBLIOGRAFÍA**

1. Abbott D, Comby P, Charuel C, Graepel P, Hanton G, Leblanc B, Lodola A, Longeart L, Paulus G, Peters C, Stadler J. Preclinical safety profile of sildenafil. *Int J Impot Res.* 2004;16(6):498-504.
2. Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes and Development* 2000; 14: 3191-3203.
3. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev.* 1999;13(19):2478-83.
4. Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, Alessandri LM, O'Sullivan F, Burton PR, Pemberton PJ, Stanley FJ. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ.* 1998;317(7172):1554-8.
5. Baquero H, Soliz A, Neira F, Venegas ME, Sola A. Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: A pilot randomized blinded study. *Pediatrics.* 2006;117:1077-1083.
6. Belik J. Sildenafil administration during pregnancy increases fetal rat weight gain. *FASEB journal.* 2005;19:A1248.
7. Bell JE, Becher JC, Wyatt B, Keeling JW, McIntosh N. Brain damage and axonal injury in a Scottish cohort of neonatal deaths. *Brain.* 2005;128(Pt 5):1070-81.
8. Buhimschi CS, Garfield RE, Weiner CP, Buhimschi IA. The presence and function of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:268-274.

9. Buhimschi I, Yallampalli C, Chwalisz K, Garfield RE. Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2723-30.
10. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF $\beta$ 3. *J Clin Invest* 2000;105:577–87.
11. Carbajo Rueda M, Muñoz Rodríguez M, Fernández Celadilla L. IGF-I, 17 $\beta$ -estradiol and progesterone in SHR and in rats treated with L-NAME: fetal-placental development. *Arch Gynecol Obstet.* 2004;270(4):235-9.
12. Cauli O, Herraiz S, Pellicer B, Pellicer A, Felipe V. Treatment with sildenafil prevents impairment of learning in rats born to pre-eclamptic mothers. *Neuroscience.* 2010 In press.
13. Cheng, S.W.; Chou, H.C.; Tsou, K.I.; Fang, L.J.; Tsao, P.N. Delivery before 32 weeks of gestation for maternal pre-eclampsia: neonatal outcome and 2-year developmental outcome. *Early Hum. Dev.*, 2004, 76, 1, 39-46.
14. Conrad KP, Kerchner LJ, Mosher MD. Plasma and 24-h NO(x) and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NO(x) diet. *Am J Physiol.* 1999;277:F48-57.
15. Coppage KH, Sun X, Baker RS, Clark KE. Expression of phosphodiesterase 5 in maternal and fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1005-1010.
16. Cross JC. 2000. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*; 11:105-113.



17. De Rijk EP, Van Esch E, Flik G. Pregnancy dating in the rat: Placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30(2): 271-82.
18. DeVore GR, Horenstein J. Color doppler identification of a pericardial effusion in the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1994;4:115-120.
19. De Vries LS, Van Haastert IL, Rademaker KJ, Koopman C, Groenendaal F. Ultrasound abnormalities preceding cerebral palsy in high-risk preterm infants. *J Pediatr.* 2004;144(6):815-20.
20. Downing JW, Ramasubramanian R, Johnson RF, Minzter BH, Paschall RL, Sundell HW, Engelhardt B, Lewis R. Hypothesis: Selective phosphodiesterase-5 inhibition improves outcome in preeclampsia. *Med Hypotheses.* 2004;63:1057-1064.
21. Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipe V. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology.* 2005;41:299-306.
22. Fernández Celadilla L, Carbajo Rueda M, Muñoz Rodríguez M. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats: effects on blood pressure, fetal growth and litter size. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;271(3):243-8.
23. Fusco F, Razzoli E, Imbimbo C, Rossi A, Verze P, Mirone V. A new era in the treatment of erectile dysfunction: chronic phosphodiesterase type 5 inhibition.. *BJU Int.* 2010;105(12):1634-9.
24. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277(5332):1669-72.
25. Geusens N, Verlohren S, Luyten C, Taube M, Hering L, Vercruyse L, Hanssens M, Dudenhausen JW, Dechend R, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast

- invasion, spiral artery remodelling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of pre-eclampsia. *Placenta*. 2008;29(7):614-23.
26. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(8):689-702.
27. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension*. 2007;50(6):1142-7.
28. Gomez-Pinedo U, Rodrigo R, Cauli O, Herraiz S, Garcia-Verdugo JM, Pellicer B, Pellicer A, Felipo V. cGMP modulates stem cells differentiation to neurons in brain in vivo. *Neuroscience*. 2010;165:1275-1283.
29. Gonzalez, F.F.; Miller, S.P. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2006, 91, 6, F454-9.
30. Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels: A human in vivo study. *Circulation*. 2005;111:742-746.
31. Hecher K, Campbell S, Snijders R, Nicolaides K. Reference ranges for fetal venous and atrioventricular blood flow parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1994;4:381-390.
32. Helou SM, Hudak ML, Jones MD Jr. Cerebral blood flow response to hypercapnia in immature fetal sheep. *Am J Physiol*. 1991;261(5 Pt 2):H1366-70.
33. Hüppi PS. Immature white matter lesions in the premature infant. *J Pediatr*. 2004;145(5):575-8

- 
34. Hustin J, Schaaps JP, Lambotte R. Anatomical studies of the utero-placental vascularization in the first trimester of pregnancy. *Trophoblast research* 1988;3:49-60.
  35. Hustin J. Blood flow in the intervillous space in the first trimester. *Placenta*. 1995;16(7):659-60.
  36. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long-term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ*. 2001; 323: 1213–1217.
  37. Jaffe R, Dorgan A, Abramowicz JS. Color Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the first trimester: value in predicting pregnancy failure or complication. *AJR Am J Roentgenol*. 1995 May;164(5):1255-8.
  38. Jaillard S, Larrue B, Deruelle P, Delelis A, Rakza T, Butrous G, Storme L. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitor on pulmonary vascular reactivity in the fetal lamb. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:935-942.
  39. Jänicke B, Coper H. The effects of prenatal exposure to hypoxia on the behavior of rats during their life span. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 ;48(4):863-73.
  40. Jensen, A.; Garnier, Y.; Middelani, J.; Berger, R. Perinatal brain damage--from pathophysiology to prevention. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2003, 110 Suppl 1, S70-9.
  41. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. changes during normal pregnancy. *Placenta*. 2004;25:114-126.
  42. Lacassie HJ, Germain AM, Valdes G, Fernandez MS, Allamand F, Lopez H. Management of Eisenmenger syndrome in pregnancy with sildenafil and L-arginine. *Obstet Gynecol*. 2004;103:1118-1120.

- 
43. Lees C, Valensise H, Black R, Harrington K, Byiers S, Romanini C, Campbell S. The efficacy and fetal-maternal cardiovascular effects of transdermal glyceryl trinitrate in the prophylaxis of pre-eclampsia and its complications: a randomized double-blind placebo-controlled trials. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998 Nov;12(5):334-8.)
44. Lodygensky GA, Seghier ML, Warfield SK, Tolsa CB, Sizonenko S, Lazeyras F, Hüppi PS. Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus. *Pediatr Res.* 2008;63(4):438-43.
45. Lucier, G.W., and McDaniel, O.S. 1977. Steroid and non-steroid UDP glucuronyltransferase: glucuronidation of synthetic estrogens as steroids. *J Steroid Biochem.* 8:867-72.
46. Many,A.; Fattal,A.; Leitner,Y.; Kupfermenc,M.J.; Harel,S.; Jaffa,A. Neurodevelopmental and cognitive assessment of children born growth restricted to mothers with and without preeclampsia. *Hypertens.Pregnancy,* 2003, 22, 1, 25-29
47. Maulik D. Spectral doppler sonography: Waveforms analysis and hemodynamic interpretation. In: Maulik D, Zalud I, eds. *Doppler Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005:35-56.
48. Meekings JV, Luckas MJM, Pijenborg R, Mc Fadyen IR. Histological study of the spiral arteries and the presence of maternal erythrocytes in the intervillous space during the first trimester of normal human pregnancy. *Placenta* 1997;18:459-64.
49. Meher S, Duley L. Nitric oxide for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(2):CD006490.

- 
50. Merviel P, Carbillon L, Challier JC, Rabreau M, Beaufils M, Uzan S. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115(2):134-47.
51. Miller SL, Loose JM, Jenkin G, Wallace EM. The effects of sildenafil citrate (viagra) on uterine blood flow and well being in the intrauterine growth-restricted fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200:102.e1-102.e7.
52. Molelekwa V, Akhter P, McKenna P, Bowen M, Walsh K. Eisenmenger's syndrome in a 27 week pregnancy--management with bosentan and sildenafil. *Ir Med J.* 2005;98:87-88.
53. Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(5 Pt 1):1458-66.
54. Momma K, Ito T, Ando M. In situ morphology of the ductus venosus and related vessels in the fetal and neonatal rat. *Pediatr Res.* 1992;32:386-389.
55. Morris NH, Sooranna SR, Learchmont JG, Poston L, Ramsey B, Pearson JD, Steer PJ. Nitric oxide synthase activities in placental tissue from normotensive, pre-eclamptic and growth retarded pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1995;102, 711-714.
56. Myatt L, Brewer A, Brockman DE. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164(2):687-92.
57. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010. Suppl:S66-9

- 
58. Nathan L, Cuevas J, Chaudhuri G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. *Br J Pharmacol.* 1995;114(5):955-60.
59. Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res.* 2000;87(5):406-11.
60. Ounsted MK, Moar VA, Good FJ, Redman CW. Hypertension during pregnancy with and without specific treatment; the development of the children at the age of four years. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:19-24.
61. Pallarés P, Gonzalez-Bulnes A. Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice is established from early stages of pregnancy. *Biol Reprod.* 2008;78:1002-1006.
62. Phillips PG, Birnby LM, Narendran A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995 May;268(5 Pt 1):L789-800.
63. Ramesar SV, Mackraj I, Gathiram P, Moodley J. Sildenafil citrate improves fetal outcomes in pregnant, L-NAME treated, Sprague-Dawley rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(1):22-6.
64. Ramsay B, Sooranna SR, Johnson MR. Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 1996, 87, 249–253.
65. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308(5728):1592-4.
66. Rees S, Mallard C, Breen S, Stringer M, Cock M, Harding R. Fetal brain injury following prolonged hypoxemia and placental insufficiency: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998;119(3):653-60

- 
67. Refuerzo JS, Sokol RJ, Aranda JV, Hallak M, Hotra JW, Kruger M, Sorokin Y. Sildenafil citrate and fetal outcome in pregnant rats. *Fetal Diagn Ther*. 2006;21(3):259-63.
68. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001;357(9249):53-6.
69. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*. 2005;46:1243-1249.
70. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M; NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 2003;41(3):437-45.
71. Samangaya RA, Mires G, Shennan A, Skillern L, Howe D, McLeod A, Baker PN. A randomised, double-blinded, placebo-controlled study of the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil for the treatment of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2009;28:369-382.
72. Sanchez-Aparicio P, Mota-Rojas D, Nava-Ocampo AA, Trujillo-Ortega ME, Alfaro-Rodriguez A, Arch E, Alonso-Spilsbury M. Effects of sildenafil on the fetal growth of guinea pigs and their ability to survive induced intrapartum asphyxia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:127.e1-127.e6.
73. Sasser JM, Baylis C. Effects of sildenafil on maternal hemodynamics and fetal growth in normal rat pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R433-8.
74. Scherjon S, Briët J, Oosting H, Kok J. The discrepancy between maturation of visual-evoked potentials and cognitive outcome at five years in very preterm

- infants with and without hemodynamic signs of fetal brain-sparing. *Pediatrics*. 2000;105(2):385-91.
75. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(4):944-8.
76. Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH and EL-Dien HM. Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Gynaecol Obstet*. 2002;72(2):123-133.
77. Sher G, Fisch JD. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril*. 2002;78(5):1073-6.
78. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365 (9461):785-99, 2005.
79. Sibai BM. Imitators of severe pre-eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33(3):196-205.
80. Sooranna, S.R., Placental nitric oxide metabolism. *Reprod. Fertil. Dev.*,1995;7, 1525–1531
81. Sooranna, S.R., Placental nitric oxide metabolism. *Reprod. Fertil. Dev.*,1995;7, 1525–1531.
82. Strijbis, E.M.; Oudman, I.; van Essen, P.; MacLennan, A.H. Cerebral palsy and the application of the international criteria for acute intrapartum hypoxia. *Obstet. Gynecol.*, 2006, 107, 6, 1357-1365.



83. Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H. Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta., *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002 282(4):C762-7.
84. Thompson DK, Warfield SK, Carlin JB, Pavlovic M, Wang HX, Bear M, Kean MJ, Doyle LW, Egan GF, Inder TE. Perinatal risk factors altering regional brain structure in the preterm infant. *Brain*. 2007; 30(Pt 3):667-77.
85. Tranquilli AL, Landi B. The origin of pre-eclampsia: From decidual "hyperoxia" to late hypoxia. *Medical hypotheses* 2010 In press.
86. Vargas-Origel A, Gómez-Rodríguez G, Aldana-Valenzuela C, Vela-Huerta MM, Alarcón-Santos SB, Amador-Licon N. The use of sildenafil in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Perinatol*. 2010;27(3):225-30.
87. Verlohren S, Niehoff M, Hering L, Geusens N, Herse F, Tintu AN, Plagemann A, LeNoble F, Pijnenborg R, Muller DN, Luft FC, Dudenhausen JW, Gollasch M, Dechend R. Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. *Hypertension*. 2008;51(2):547-53.
88. Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(2):91-5.
89. Vidavalur R, Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Krueger W, Maulik N. Sildenafil augments early protective transcriptional changes after ischemia in mouse myocardium. *Gene*. 2009;430(1-2):30-7.
90. Villanueva-García D, Mota-Rojas D, Hernández-González R, Sánchez-Aparicio P, Alonso-Spilsbury M, Trujillo-Ortega ME, Necoechea RR, Nava-Ocampo AA.

- A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and pre-term labour. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27(3):255-9.
91. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 1999; 29(3):297-310.
92. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2000;356(9237):1260-5.
93. Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. Sildenafil citrate (viagra) enhances vasodilatation in fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2550-2555.
94. Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Kenny LC, Taggart MJ, Skillern L, Machin I, Baker PN. Phosphodiesterase-5 inhibitors and omental and placental small artery function in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;127:41-49.
95. Zarlingo TJ, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Myatt L. Comparative localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in haemochorial and epitheliochorial placentae. *Placenta.* 1997; 18(7):511-20.
96. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest.* 1993;91(3):950-60.
97. Zoma WD, Baker RS, Friedman A, Clark KE. Sildenafil citrate (viagra) increases uterine blood flow and potentiates estrogen-induced vasodilatation. *J Soc Gynecol Invest.* 2001;8:286-A



Tabla resumen número embriones/fetos/crías/madres utilizadas.

Parametro	N (ratas/fetos por grupo)			
	PE	PE+SC	SC	Control
Ratas gestantes (SBP, proteinuria, Doppler, viscosidad sanguínea y plaquetas...)	21	17	25	23
Ratas no gestantes	6	5	6	6
Crecimiento intrauterino E8 (fetos analiz)	27	45	43	34
Crecimiento intrauterino E11	11	13	30	36
Crecimiento intrauterino E18	19	65	60	66
Placentas e hígados E18	14	24	35	25
Seguimiento Postnatal (peso-supervivencia)	16	25	23	20
Test desarrollo neurológico	8	8	8	8
LC-MS en hígado fetal.			35	25

