

Hiperoxia por dos horas produce daño morfológico cerebral luego de asfixia neonatal experimental

Two-hour hyperoxia following experimental neonatal asphyxia produces morphological brain damage

Melva Benavides¹, Roberto Shimabuku², Arturo Ota^{2,3}, Sonia Pereyra⁴, Carlos Delgado⁵, Víctor Sánchez^{2,5}, Graciela Nakachi², Pablo Velásquez^{2,6}, Flor Cruz¹

¹ Unidad de Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN), Lima, Perú.

² Departamento de Pediatría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

³ Servicio de Neonatología, Hospital Edgardo Rebagliati, EsSalud, Lima, Perú.

⁴ Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.

⁵ Servicio de Neonatología, Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.

⁶ Departamento de Neonatología, Instituto Nacional Materno Perinatal, Lima, Perú.

Resumen

Objetivos: Determinar el efecto de una exposición de dos horas de hiperoxia al 21%, 40% y 100% sobre la morfología cerebral, en un modelo experimental de asfixia neonatal. **Diseño:** Estudio experimental. **Institución:** Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú. **Material biológico:** Ratas albinas Holtzmann. **Intervenciones:** Ciento veinte ratas albinas Holtzmann de una semana de nacidas (a excepción del grupo control) fueron sometidas a asfixia experimental por ligadura de la arteria carótida izquierda y luego expuestas a hipoxia (oxígeno al 8%). Después fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: exposición por dos horas a O₂ al 100%, a O₂ al 40%, a O₂ al 21% y un grupo control (no expuesto a asfixia experimental). El daño cerebral fue evaluado mediante la medición del peso cerebral y el porcentaje del área cerebral con daño microscópico. **Principales medidas de resultados:** Daño cerebral. **Resultados:** El peso cerebral promedio fue menor en los animales de los grupos sometidos a hiperoxia experimental (ANOVA; p<0,001). Se presentó daño cerebral microscópico con mayor frecuencia en el grupo sometido a hipoxia experimental que recibió O₂ 100% por dos horas y con menor frecuencia en el que recibió O₂ al 40% (60% versus 43,3%), diferencia que fue estadísticamente significativa (prueba χ^2 ; p<0,001). El grupo sometido a hipoxia experimental que recibió O₂ 100% tuvo un mayor porcentaje promedio de área cerebral con daño microscópico (18,3%), en comparación con los otros grupos de hipoxia experimental, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (ANOVA; p=0,123). **Conclusiones:** La hiperoxia al 100% por dos horas se asoció con menor peso cerebral y mayor daño cerebral en animales de experimentación sometidos a asfixia neonatal experimental.

Palabras clave: Asfixia neonatal, hiperoxia, isquemia-hipoxia del cerebro, experimento de laboratorio.

Abstract

Objectives: To determine the effect of 2-hour exposure to 21% O₂, 40% O₂ and 100% O₂ on cerebral morphology in an experimental model of neonatal asphyxia. **Design:** Experimental study. **Setting:** Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Peru. **Biologic material:** Holtzman albino rats. **Interventions:** A sample of 120 one week-old Holtzman albino rats (with the exception of the control group) underwent experimental asphyxia by left carotid artery ligation and then exposition to hypoxia (8% O₂); thereafter rats were randomly assigned to one of the following groups: exposition for two hours to 100% O₂, to 40% O₂, to 21% O₂, and a control group (not exposed to experimental asphyxia). Brain damage was determined by brain weight and percentage of microscopic brain area damage. **Main outcome measures:** Brain damage. **Results:** Brain weight was lower in animals with experimental hyperoxia (ANOVA, p<0.001). Microscopic damage was more frequent in the group receiving 100% O₂ for two hours and with less frequency in the group receiving 40% O₂ (60% versus 43.3%). The difference was statistically significant (χ^2 test: p<0.001). The group receiving 100% O₂ had more microscopic brain damage (18.3%) in comparison with the other groups of experimental hypoxia, but the difference was not statistically significant (ANOVA, p=0.123). **Conclusions:** Following neonatal asphyxia 100% two-hour hyperoxia was associated with less brain weight and more damage in experimental animals.

Keywords: Asphyxia neonatorum, hyperoxia, hypoxia-ischemia brain.

INTRODUCCIÓN

La asfixia al nacer es una patología frecuente en el recién nacido y una de las intervenciones es la administración de oxígeno suplementario durante la reanimación. La asfixia neonatal continúa siendo uno de los más importantes problemas en neonatología y la encefalopatía hipóxico-isquémica resultante constituye una de las causas más prevalentes de secuela neurológica en niños⁽¹⁾. Varias comunicaciones han demostrado que administrar oxígeno suplementario incrementa significativamente la morbilidad y mortalidad en los neonatos a término o cerca a término y que no debe ser usado como medida de rutina^(2,3). El empleo de oxígeno al 100% en la reanimación es un procedimiento aún usado en los casos de asfixia neonatal en humanos, aunque revisiones recientes muestran que el aire ambiental puede ser más beneficioso que el oxígeno al 100%^(2,4).

Debido a la naturaleza del problema, las investigaciones para asfixia neonatal y encefalopatía hipóxico-isquémica se realizan en modelos experimentales con animales. El modelo de Levine en ratas es actualmente el más usado en hipoxia isquemia, debido a que el sistema nervioso central de estos roedores es inmaduro al nacimiento y su neurodesarrollo a la segunda semana posnatal corresponde al del cerebro de un neonato humano a término; además, se le considera un modelo bien caracterizado y realizable^(5,6). También existen otros modelos con diferentes animales, pero en nuestro centro de investigación se ha adquirido experiencia con el modelo de Levine modificado^(4,7-10). El modelo experimental de hipoxia isquemia de Levine combina la ligadura unilateral de la carótida común y posterior exposición a concentraciones bajas de oxígeno⁽⁵⁾.

En un estudio previo, Shimabuku y col. encontraron daño morfológico cerebral asociado con hiperoxia al 100% por 24 horas, luego de asfixia neonatal experimental en ratas Holtzmann recién nacidas⁽¹¹⁾. Esta exposición a hiperoxia

por 24 horas fue realizada porque otros experimentos con menor tiempo de exposición (entre 10 y 30 minutos) no habían producido evidencias de daño morfológico cerebral^(12,13).

La exposición a hiperoxia por 24 horas ha recibido observaciones por no ser un modelo justificado fisiológicamente; y de acuerdo a una estimación realizada por Chapados (2008) en un escenario clínico, la duración media del sufrimiento fetal desde su reconocimiento hasta el parto por emergencia es cercana a 130 minutos^(14,15).

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de exposición a hiperoxia al 40% y 100% durante 2 horas sobre la morfología cerebral en un modelo experimental de asfixia neonatal.

MÉTODOS

La muestra experimental estuvo constituida por 120 ratas albinas Holtzmann de una semana de edad. El tamaño de la muestra se calculó usando el programa EpiInfo del paquete informático EpiInfo (versión 6.04, 2001, CDC, WHO), con las siguientes variables: razón de no expuestos por expuesto 1,0; valor detectado de riesgo relativo 5,0; tasa de ataque entre los no expuestos 10,0; poder de 80%; nivel de confianza de 95%; asignando en forma aleatoria las ratas a los diferentes grupos. Con estos datos, la muestra mínima por cada grupo de investigación fue 30. Luego del procedimiento de asfixia (con excepción del grupo control) se procedió a la asignación aleatoria de los animales de experimentación a uno de los siguientes grupos: expuesto a O₂ al 100% por dos horas, expuesto a O₂ al 40% por dos horas, expuesto a O₂ a 21% (aire ambiental) y grupo control.

El estudio de asfixia experimental fue realizado con ratas albinas de siete días de nacidas de la especie Holtzmann, las cuales fueron criadas en el bioterio del Servicio de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN), con alimentos estándar adquiridos en la Universidad Nacional

Agraria (Lima-Perú) y agua ad libitum. Las condiciones ambientales en el Servicio de Cirugía Experimental fueron: temperatura de 18 a 24°C, humedad relativa (70 a 90%) y ciclos luz-oscuridad naturales (11 a 13 de 24 horas), durante el periodo del trabajo.

La asfixia experimental se llevó a cabo con ratas de 7 días de edad, de parto espontáneo, amamantadas por sus madres hasta el momento de seleccionarlas para el experimento y con un peso entre los 10 y 14 gramos, el cual fue medido con una balanza analítica digital marca Acculab Sartorius Group, modelo VIC 303 (con exactitud de 10⁻³ gramos).

La primera parte del procedimiento fue la isquemia, por medio de la ligadura de la arteria carótida izquierda usando microscopio estereoscópico, previa anestesia inhalatoria con éter; se valoró la presencia de ptosis palpebral como confirmación indirecta de la ligadura del paquete carotideo. Se inyectó dextrosa al 5%, en volumen equivalente al 5% del peso corporal, vía subcutánea en el espacio interescapular, para contrarrestar el efecto del ayuno. La herida operatoria fue cerrada con pegamento sintético. La segunda parte del procedimiento fue la hipoxia con exposición a oxígeno con una concentración al 8%, en una cámara de plexiglás (20 x 20 x 20 cm), con un flujo de 4 L/min, por 2 horas. Las cámaras de plexiglás fueron colocadas dentro de una incubadora neonatal estándar con la temperatura a 33 a 34 °C. La concentración de oxígeno fue controlada con oxímetro ambiental (Ohmeda 5120, BOC Health-Care, Madison, USA.)

Luego del procedimiento de asfixia se procedió a la asignación aleatoria de los animales de experimentación a los grupos de investigación. Al término de la exposición a hiperoxia por dos horas, las ratas fueron regresadas a las jaulas con sus madres y una semana después fueron sacrificadas para su evaluación correspondiente.

El sacrificio se realizó por decapitación a los 14 días de edad e inmediata-

Tabla 1. Peso corporal promedio (\pm DE)* de los animales (en gramos) por grupo de investigación, a los 7 y 14 días de vida.

Grupo de investigación	n	A los 7 días	A los 14 días
Grupo control	30	13,8 \pm 2,3	27,2 \pm 6,3
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 21%	30	13,4 \pm 1,9	19,6 \pm 6,7**
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 40% 2 horas	30	13,8 \pm 2,4	20,0 \pm 6,5**
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 100% 2 horas	30	13,2 \pm 2,4	18,6 \pm 7,6*

* DE: desviación estándar.

** Diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, ANOVA; $p < 0,001$.

mente se realizó la extracción y medición del peso del cerebro. Se descartó el cerebelo, tubérculos olfatorios y tronco cerebral. El daño cerebral fue evaluado mediante la medición del peso cerebral de los animales y el porcentaje del área cerebral con daño microscópico (tinción hematoxilina-eosina). La evaluación fue efectuada por técnica del doble ciego, ya que ni el investigador ni los que realizaban las mediciones conocían a qué grupo pertenecía cada animal de experimentación.

Para el análisis estadístico se usó el programa estadístico SPSS v.15 (SPSS Inc.). Se efectuó un análisis descriptivo, obteniéndose frecuencias, porcentajes, medidas de tendencia central y de dispersión. Para la estadística inferencial se realizó análisis de varianza de un factor (ANOVA), previa evaluación de la homogeneidad de las varianzas de cada grupo con la prueba de Levene. En caso de las varianzas homogéneas, la comparación de grupos (análisis *post hoc*) se usó la prueba de Tukey (peso de los animales los días 7 y 14 postasfixia experimental, porcentaje de daño microscópico), mientras que en las varianzas no homogéneas se empleó la prueba de Dunnett (peso cerebral). Para comparar el daño cerebral entre los grupos de experimentación se utilizó la prueba χ^2 de Pearson. Los cálculos fueron realizados con un nivel de confianza de 95%.

Este estudio fue aprobado por la Dirección de Investigación del INSN y se realizó de acuerdo con las normas internacionales para el cuidado y manejo de animales de laboratorio (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Normas Internacio-

nales para la Investigación Biomédica con animales ⁽¹⁶⁾).

RESULTADOS

Al inicio del experimento (7 días de vida), los pesos de los animales entre los diferentes grupos de investigación fueron semejantes (ANOVA; $p = 0,796$); sin embargo, para el día 14 (7 días después de la hipoxia experimental) se observó diferencias significativas en el peso promedio de los animales, siendo el peso del grupo control significativamente mayor que el de los tres grupos sometidos a hipoxia experimental (ANOVA; $p < 0,001$). Esto se muestra en la tabla 1.

Para el día 14 también se observó que el peso promedio del cerebro de los

animales de experimentación fue significativamente menor en los animales de los tres grupos sometidos a hipoxia experimental en comparación con el grupo control (ANOVA; $p < 0,001$); la prueba de Dunnett para varianzas no homogéneas no mostró diferencia significativa entre los grupos sometidos a hipoxia experimental (tabla 2).

El estudio histopatológico de los cerebros mostró que el daño cerebral microscópico se presentó con mayor frecuencia en el grupo sometido a hipoxia experimental que recibió O₂ 100% por dos horas y con menor frecuencia en el que recibió O₂ al 40% (60,0% vs 43,3%, respectivamente), para lo cual existió diferencia estadísticamente significativa (prueba χ^2 de Pearson; $p < 0,001$). Esto se muestra en la tabla 3.

Al evaluarse el porcentaje de área cerebral con daño microscópico (tabla 4), se observó que fue el grupo sometido a hipoxia experimental que recibió O₂ al 100% el que tuvo en promedio un mayor porcentaje (18,3%) en comparación con los otros grupos de hipoxia experimental, mostrando un efecto de dosis-respuesta (mayor concentración de oxígeno, mayor daño cerebral) (ver figura), aunque la diferencia entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ANOVA; $p = 0,123$).

Tabla 2. Peso cerebral promedio (en gramos) de los animales de experimentación por grupo de investigación.

Grupo de investigación	Peso promedio \pm DE
Grupo control	0,867 \pm 0,054 *
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 21%	0,717 \pm 0,095 **
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 40% 2 horas	0,724 \pm 0,087 **
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 100% 2 horas	0,686 \pm 0,096 **

* ANOVA; $p < 0,001$. ** Prueba de Dunnett no significativa.

Tabla 3. Frecuencia de daño cerebral microscópico según grupo de investigación.

Grupo de investigación	Frecuencia	Porcentaje
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 21%	17	56,7
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 40% 2 horas	13	43,3*
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 100% 2 horas	18	60,0*

* Prueba χ^2 cuadrado de Pearson; $p < 0,001$.

Tabla 4. Porcentaje promedio de área cerebral con daño microscópico en los animales de experimentación, por grupo de investigación.

Grupo de investigación	Porcentaje de daño
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 21%	11,8%
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 40% 2 horas	16,9%
Hipoxia experimental, asfixia + O ₂ 100% 2 horas	18,3%

ANOVA; p=0,123.

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados muestran que el modelo experimental de asfixia neonatal en ratas, simulando isquemia por ligadura carotidea e hipoxia por dos horas, produce una disminución del peso corporal y cerebral a los 7 días en los diferentes grupos de experimentación.

De acuerdo al consenso internacional más reciente⁽³⁾, es mejor iniciar con aire ambiental la ventilación a presión positiva en recién nacidos a término que requieren reanimación, en vez de usar oxígeno al 100%. No obstante, si a pesar de tener una ventilación efectiva no se logra incrementar la frecuencia cardíaca o si la oximetría no es aceptable, se debe considerar el uso de

concentraciones más altas de oxígeno. A pesar de todo, el uso de oxígeno al 100% para este procedimiento es materia de controversia.

Estudios en animales y ensayos clínicos sobre este tema no han alcanzado conclusiones definitivas, siendo todavía más difícil encontrar consensos con relación a los neonatos prematuros^(3,17). Las evidencias de un reciente metaanálisis demuestran que la reanimación con O₂ al 21% está asociada a una reducción significativa de la mortalidad neonatal y de la encefalopatía hipóxico-isquémica⁽¹⁸⁾.

La presente investigación muestra que de las tres concentraciones de oxígeno estudiadas (21%, 40% y 100%) en un modelo de asfixia neonatal por un

período de 2 horas, es la concentración al 100% la que se asocia a mayor frecuencia de daño cerebral, mayor porcentaje de daño cerebral microscópico y la que produce una marcada reducción del peso cerebral. Nuestros resultados concuerdan con la hipótesis de que el suministro de O₂ al 100% produce mayor daño cerebral en comparación con el oxígeno ambiental y con el suministro de O₂ al 40% (60% con el O₂ al 100%, 56,7% con el O₂ al 21% y 43,4% con el O₂ al 40%). Estos resultados son semejantes a los encontrados en un estudio previo realizado por los autores⁽¹¹⁾, en el que se comparó el suministro de O₂ al 100% con O₂ al 21% luego de asfixia experimental, observándose mayor daño cerebral en los animales expuestos a O₂ al 100% (70,8%) en comparación con los expuestos a O₂ al 21% (37,5%). Si bien se ha observado diferentes valores absolutos de daño cerebral microscópico, no es posible establecer que estas diferencias sean debidas a menor tiempo de exposición a hiperoxia. No existe diferencia estadística cuando se compara los resultados de daño cerebral con O₂ 100% por 24 horas del experimento anterior, con O₂ 100% por 2 horas en el experimento actual (70,8% versus 60%; prueba χ^2 p=0,4). Tampoco se observa diferencias estadísticas al comparar el daño cerebral asociado con la exposición a O₂ 21% (37,5% versus 56,7%; prueba χ^2 p=0,2).

Por otro lado, fue la concentración de oxígeno al 40% en los animales de experimentación la que se asoció a una menor frecuencia de daño cerebral, lo que reforzaría la hipótesis de que el suministro de concentraciones de O₂ inferiores al 100% pero mayores del 21% podría tener mayor beneficio para los pacientes con encefalopatía hipóxico-isquémica, lo que redundaría en una menor morbimortalidad neonatal. Sin embargo, al comparar los efectos de reanimación con tres concentraciones de oxígeno (21%, 40% y 100%), los daños microscópicos observados después de la injuria no presentaron resultados consistentes. El daño cerebral microscópico en los grupos de O₂ 40% y 100%

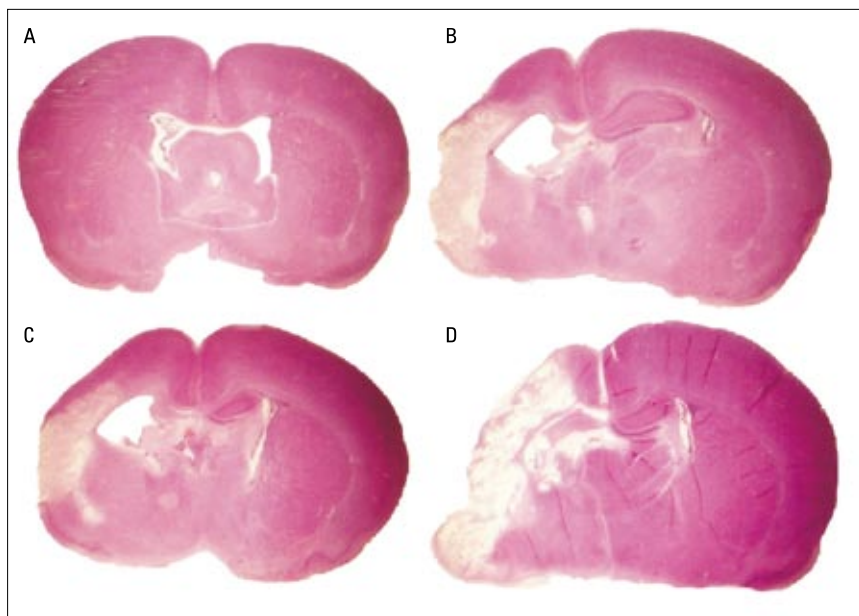


Figura 1. Daño cerebral microscópico por grupo de investigación. A. Control; B. Asfixia + O₂ 21%; C. Asfixia + O₂ 40% por 2 horas; D. Asfixia + O₂ 100% por 2 horas. Aumento: 10X; coloración hematoxilina-eosina.

fue diferente, pero ambos grupos no resultaron diferentes del grupo de O₂ 21%. Además, el porcentaje de áreas dañadas resultó semejante entre los tres grupos.

Con relación al peso de los animales, para el día 7 antes de someterlos a asfixia experimental no existía diferencia significativa para los grupos de investigación, lo cual demuestra que son comparables. Para el día 14, luego de realizarse el procedimiento de asfixia experimental, se observó un peso significativamente menor en los animales que recibieron oxígeno al 21%, 40% y 100% en comparación con las ratas del grupo control, lo cual muestra que los efectos de la asfixia no se restringen al sistema nervioso.

Autores como Yager⁽⁶⁾ y Chapados⁽¹⁵⁾ mencionaron que las principales ventajas de este modelo experimental en ratas están relacionadas con la disponibilidad y manejo de mayores números de animales, que permite mayor número de especímenes para análisis con menores recursos, que al usar otros animales más grandes (como ovejas o cerdos). Sin embargo, una desventaja de los modelos animales es la dificultad de extrapolar sus resultados para los humanos. Es cierto que en la asfixia neonatal existen fenómenos de isquemia e hipoxia, que son simulados con el modelo experimental, pero adicionalmente se presentan otros fenómenos de reperfusión, edema, efectos de radicales libres y falla orgánica múltiple que no son totalmente representados en el modelo^(5,13,15,19). Adicionalmente, el tamaño de las camadas puede influir sobre los resultados como factor de confusión, aunque su influencia sobre el peso corporal, desarrollo cerebral o la susceptibilidad a la injuria cerebral es compleja⁽¹⁵⁾.

En conclusión, la hiperoxia al 100% por dos horas se asoció con menor peso cerebral y mayor daño cerebral en animales de experimentación luego de asfixia neonatal experimental. Dichos resultados sugieren que la reanimación con concentraciones de oxígeno menores del 100% podrían ser beneficiosas para los pacientes con asfixia neonatal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Trastornos del sistema nervioso central. En: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson Tratado de Pediatría*. 18ª edición. Barcelona: Elsevier España; 2009:713-22.
2. Saugstad OD. Optimal oxygenation at birth and in the neonatal period. *Neonatology*. 2007;91:319-22.
3. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al; Neonatal Resuscitation Chapter Collaborators. Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Pediatrics*. 2010;126(5):e1319-44.
4. Saugstad OD, Ramji S, Vento M. Oxygen for newborn resuscitation: how much is enough? *Pediatrics*. 2006;118:789-92.
5. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;422:85-8.
6. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci*. 2005;27:81-6.
7. Painter MJ. Animal models of perinatal asphyxia: contributions, contradictions, clinical relevance. *Semin Pediatr Neurol*. 1995;2:37-56.
8. Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatric Neurol*. 2009;40(3):156-67.
9. Vento M, Saugstad OD. Chapter 25, Part 3 Oxygen Therapy. En: Martin RJ, Fanaroff AA and Walsh MC Editores. *Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. Diseases of the Fetus and Infant*. 8th edition. Philadelphia: Mosby Elsevier. 2006:498-500.
10. Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K. Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177:519-26.
11. Shimabuku R, Ota A, Pereyra S, Véliz B, Paz E, Nakachi G, More M, Oliveros M. Hyperoxia with 100% oxygen following hypoxia-ischemia increa-

- ses brain damage in newborn rats. *Biol Neonate*. 2005;88:168-71.
12. Rootwelt T, Løberg EM, Moen A, Oyasaeter S, Saugstad OD. Hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn pig. Changes in blood pressure, base deficit, and hypoxanthine and brain morphology. *Pediatr Res*. 1992;32:107-13.
13. Bågenholm R, Nilsson UA, Kjellmer I. Formation of free radicals in hypoxic ischemic brain damage in the neonatal rat, assessed by an endogenous spin trap and lipid per oxidation. *Brain Res*. 1997;773:132-8.
14. Presti AL, Kishkurno SV, Slinko SK, Randis TM, Ratner VI, Polin RA, et al. Reoxygenation with 100% oxygen versus room air: late neuroanatomical and neurofunctional outcome in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatric Res*. 2006;60(1): 55-9.
15. Chapados I, Cheung PY. Not all models are created equal: animal models to study hypoxic-ischemic encephalopathy of the newborn. *Neonatology*. 2008;94:293-9.
16. Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Normas Internacionales para la Investigación Biomédica con animales. *Bol Of Sanit Panam*. 1990;108:657-81.
17. Davis PG, Tan A, O'Donnell CP, Schulze A. Resuscitation of newborn infants with 100% oxygen or air: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2004;364:1329-33.
18. Saugstad OD, Ramji S, Soll RF, Vento M. Resuscitation of newborns infants with 21% or 100% oxygen: an updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology*. 2008;94:176-82.
19. Oakden E, Chiswick M, Rothwell N, Loddick S. The influence of litter size on brain damage caused by hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 2002;52:692-6.

Artículo recibido el 15 de diciembre de 2012 y aceptado para publicación el 11 de mayo de 2013.

Trabajo presentado en la XI Jornadas Científicas Sanfermandinas, 12 al 14 de setiembre de 2012, Lima, Perú.

Trabajo publicado en forma de resumen en el Boletín de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño.

Correspondencia:

Melva Benavides-López

Instituto Nacional de Salud del Niño

Av. Brasil 600. Lima. Perú.

Correo electrónico: melvabenavides@hotmail.com