Ductus arterioso persistente y estado carencial de cobre

Francisco Alliende G.¹; Ignacio Villa-Elizaga¹;
Federico Antillón K.¹

Patent ductus arteriosus and copper-deficiency

To investigate the effects of copper-deficiency on spontaneous closure of ductus arteriosus in newborn rats, an experimental model consisting in three groups of ten female Sprague-Dowley rats each was used. Group I rats, copper-deficient, were fed a copper-free diet from 35 days before pregnancy until birth. Group II, control rats, were given a diet containing appropriate amounts of copper (6 ppm) and energy. Group III, the pair-fed rats, received a diet that was adequate in copper content but restricted in energy to the same caloric ingestion previously shown by copper deprived rats. The ductus arteriosus of 10 newborn rats of each group were studied by histological methods at sometime between the third and twelfth hour of life, and it was patent in 100%, 20% and 40% of the cases of copper deprived, control and pair fed rats respectively (Chi square test, $p = 0.0009$). The wall thickness of patent ductus from copper deprived rats were significantly lower than those from rats of the other two groups (Kruskal-Wallis Test; $p = 0.0079$). Our results suggest that materno-fetal copper deficiency significantly affects the spontaneous closure rate of the ductus arteriosus in the rat. The mechanism of this abnormal response probably includes structural changes in the ductal wall, alterations in the energy yield process or abnormal regulation of prostaglandins E2 and F2 - α synthesis.

(Key words: Patent ductus arteriosus, copper-deficiency, rats.)

El significado biológico del cobre fue evidenciado por primera vez en el año 1928 cuando Hart y cols. demostraron su esencialidad en la síntesis de hemoglobina en la rata¹. No obstante, no fue sino hasta el año 1956 cuando se describió por primera vez un estado carencial en el ser humano². Desde entonces, numerosas publicaciones tratan sobre estados de deficiencia de cobre, con especial referencia a la prematuridad, síndromes de malabsorción y nutrición parenteral³⁻⁹. El progreso en los conocimientos relativos al metabolismo del cobre y sus requerimientos en diferentes situaciones no ha impedido que continúen apareciendo publicaciones con casos clínicos de la deficiencia, como muestra de que el problema aún está vigente¹⁰⁻¹³.

La enfermedad cardíaca producida por una situación experimental de déficit de cobre ha sido caracterizada por hipertrofia y palidez del

miocardio, también por zonas de necrosis, fibrosis, aneurismas, e incluso perforaciones¹⁴. Trabajos posteriores evidenciaron desestructuración mitocondrial, déficit enzimáticos, disminución de la concentración de ATP y fosfocreatina¹⁵. Estas alteraciones, que en forma global se asemejan a aquellas encontradas en hipoxia crónica, no se asociaron a lesiones vasculares concomitantes, por lo que se consideró obedecían a un defecto primario del miocardio y fueron interpretadas como constituyentes de una miocardiopatía cobredendiente^{14, 15}.

La importancia del cobre en la normal formación de la pared de los vasos sanguíneos fue puesta de manifiesto en los años 60, al comprobarse su relación con la síntesis de elastina, en función de la actividad de la enzima lisil-oxidasa¹⁶⁻²⁰.

Un aspecto más reciente de las consecuencias del déficit de cobre en el ser humano fue puesto en evidencia por Sutton en 1985, al describir cuatro prematuros con ductus arterioso permeable, reversible únicamente a la administración de cobre²¹. Este hallazgo no ha sido objeto de mayor estudio, desconociéndose actualmente

1. Unidad de Investigación Pediátrica, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, España.

los mecanismos que en ello pudieron haber participado.

En base a estas últimas observaciones nos hemos propuesto desarrollar un modelo experimental que determine la real relación entre déficit nutricional de cobre y persistencia del ductus arterioso. Con los resultados obtenidos, junto a los conocimientos actuales, nos permitiremos esbozar una hipótesis fisiopatológica que explique tal asociación.

Material y Método

Se utilizaron 30 ratas hembras vírgenes, cepa Sprague-Dowley con peso entre 110 y 130 g (Panlab, Barcelona) que fueron colocadas en jaulas individuales de acero inoxidable en un cuarto con temperatura, luz, ventilación y humedad controladas (21 ± 2°C, ciclo de luz-oscuridad de 12 h, 50% de humedad). Utilizamos dietas purificadas en polvo, "control" o normocúprica (cobre = 6 ppm) y cuprodeficiente (cobre = 0 ppm), adquiridas en la casa Dyets Inc. Bethelham, Pensilvania, EE.UU. (referencia 100 000 y 115 501, respectivamente, del catálogo de dietas de la misma casa, edición 1989-1990). Todas ellas fueron elaboradas de acuerdo a la normativa del "American Institute of Nutrition" (AIN)^{22,23}. Las ratas fueron aclimatadas durante un período de 5 días, en el cual todas fueron alimentadas con la dieta "normocúprica". Seguidamente fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos (n: 10) que recibieron, respectivamente, una dieta carente de cobre, *ad libitum* (grupo cuprodeficiente); dieta normocúprica *ad libitum* (grupo control) y dieta normocúprica con ingesta reducida de acuerdo a la cantidad recibida por el grupo cuprodeficiente (grupo "pair fed"). A los tres grupos se les suministró agua desionizada (Milli-RO4, Millipore Corp.). Antes del apareamiento las ratas se mantuvieron con la dieta experimental durante 35 días (período pregestacional). Una vez finalizada la gestación de tres semanas, tras el parto, se inició el período neonatal del estudio. En esta última etapa, entre la 3ª y 12ª h de vida, fueron analizados los tejidos maternos y neonatales. Las ratas fueron pesadas al iniciar el período de aclimatación y la dieta experimental, luego cada 10 días durante la fase pregestacional y diariamente durante la gestación.

Las muestras de sangre fueron obtenidas del plexo retroorbitario con la ayuda de un capilar de microhematocrito heparinizado, bajo anestesia superficial con éter²⁴. La determinación de hematocrito se llevó a cabo cada 10 días en la etapa pregestacional y los días cero, 11 y 21 de la etapa gestacional. El cobre plasmático fue determinado cada 10 días en la etapa pregestacional y los días 0, 11, 21 de la etapa gestacional. Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (GBC 2000, Australia), previa dilución 1:3 en agua desionizada (Merck). El colesterol plasmático fue medido los días 10 y 30 de la etapa pregestacional y días 0 y 21 de la etapa gestacional, mediante método enzimático acoplado a la oxidación de p-amino fenazona (Boehringer Mannheim), auto-

matizado, en un equipo discreto selectivo (Hitachi 704). Se obtuvieron también muestras tisulares de las ratas madres (hígado, riñón, bazo, cerebro, corazón, pulmón y músculo) y de su descendencia (hígado, riñón, cerebro y corazón), para el análisis de cobre. El material procedente de la descendencia fue obtenido de 5 recién nacidos por cada camada (n: 50). Los órganos obtenidos fueron lavados con solución de NaCl al 90/00, pesados y almacenados en tubos de poliestireno en un congelador a -70°C hasta el día de su análisis. La determinación de Cu fue llevada a cabo empleando 0,1 g de muestra previamente secada entre 40 a 60°C durante 6 a 8 h, digerida con 0,5 ml de ácido nítrico 16 N (Suprapur, Merck) y diluida en 1 ml de agua desionizada. Las soluciones obtenidas fueron leídas en un espectrofotómetro de absorción atómica de llama, como el que ya se ha mencionado.

Microscopía óptica. El estudio del ductus arterioso se realizó en diez recién nacidos de cada grupo. Para este efecto se eligió al azar una rata recién nacida de 3 a 12 h de vida de cada camada. El procedimiento se realizó en preparaciones histológicas de cortes frontales de 10 µ, de los bloques torácicos teñidos con hematoxilina-eosina. Una vez analizados todos los cortes se seleccionaron aquellos planos que coincidían con el ductus arterioso, tras la emergencia de las arterias pulmonares. Con un microscopio (Olympus), dotado de ocular reglado (Leitz) y previa calibración con micrómetro de 100 x 0,1 mm (Graticules Ltd.), fue medido el diámetro menor de la luz y el grosor de la pared del ductus arterioso. Se consideró que un ductus persistía permeable cuando el diámetro de la luz superaba los 100 µm.

Análisis estadístico. Para comparar los resultados entre los tres grupos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de un criterio de clasificación y la prueba *a posteriori* de Scheffe ($\alpha = 0,05$). Cuando no se cumplieron las condiciones necesarias para realizar esta prueba paramétrica, se utilizó el equivalente no paramétrico Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Para estudiar las variables cualitativas (ductus cerrado/ductus permeable), se realizó un análisis de contingencia aplicando la prueba de Chi cuadrado.

Resultados

El crecimiento de las ratas fue influido por la dieta. En los grupos deficientes de cobre y de alimentación pareada el peso era significativamente menor que en el grupo control ($p < 0,01$) desde el día 28 de la etapa pregestacional. No hubo diferencias significativas entre los pesos del grupo privado de cobre y el de alimentación pareada (figura 1). La ingesta de la dieta suministrada fue significativamente menor en el grupo privado de cobre que en las ratas controles, desde los primeros días de la experimentación. La diferencia fue significativa desde la segunda semana de la fase pregestacional ($p < 0,005$) hasta la primera de la fase gestacional. Como era de

Figura 1: Evolución semanal del peso, durante los periodos pregestacional y gestacional de las ratas deprivadas de cobre, con alimentación normal y alimentación pareada.

Figura 2: Ingesta diaria promedio a lo largo de las distintas semanas de los periodos pregestacional y gestacional.

esperar, la ingesta alimentaria de los grupos cuprodeficiente y de alimentación pareada no mostró diferencias significativas (figura 2).

En los animales con dieta sin cobre se registró una rápida caída de las concentraciones plasmáticas del metal, siendo significativa la diferencia observada con respecto a los grupos control y de alimentación pareada desde el 109 día de la fase pregestacional ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos control y alimentación pareada. La concentración de cobre en los órganos maternos analizados fue significativamente inferior en el grupo cuprodeficiente que en los grupos control y de alimentación pareada ($p < 0,001$), sin que se hayan encontrado diferencias entre estos últimos. La concentración de colesterol plasmático durante la etapa pregestacional se elevó significativamente en el grupo con dieta deficiente en cobre, lo que determinó que alcanzara valores significativamente más elevados que el grupo de alimentación pareada. Durante la fase gestacional no se apreciaron variaciones significativas ni diferencias entre los tres grupos. En las ratas sometidas a dieta sin cobre se registró una caída significativa del hematocrito, desde el día 30 de la fase pregestacional ($p < 0,001$), manteniéndose una diferencia de igual grado durante la gestación, etapa durante la cual los tres grupos mostraron una moderada disminución de los valores.

En la exploración general de los recién nacidos, todos los del grupo cuprodeficiente presentaban hematomas subcutáneos, laxitud y sequedad de la piel. Algunos mostraban también dificultad respiratoria moderada y movimientos anormales. Las concentraciones de cobre en los tejidos analizados eran significativamente más bajas en los recién nacidos del grupo deficiente en cobre que en los grupos control y de alimentación pareada (tabla 1). La comparación entre estos últimos dos no reflejó diferencias significativas. No se observaron malformaciones en el corazón o grandes vasos en la inspección con estereomicroscopio. El estudio del ductus arterioso bajo microscopio de luz (figura 3) evidenció que éste permaneció abierto en 100% de los recién nacidos analizados (10/10) del grupo con dieta deficiente en cobre, en 20% (2/10) del grupo control y en el 40% (4/10) del grupo de alimentación pareada, valores significativamente diferentes de acuerdo al resultado de la prueba de Chi-cuadrado ($p < 0,0009$). Al comparar la persistencia del ductus en recién nacidos de madres deprivadas de cobre con los de alimentación pareada se comprueba $p = 0,0034$; entre los primeros y controles $p = 0,0003$, mientras que entre nacidos de animales controles y con alimentación pareada el resultado es $p = 0,329$. En la tabla 2 se expresan los promedios, desviaciones estándar y el análisis estadístico de las mediciones del grosor de

Tabla 1

Concentraciones de cobre ($\mu\text{g/g}$) en los tejidos de ratas recién nacidas de madres con dieta *ad libitum* deficiente en cobre (D), dieta normal pareada en calorías a la ingerida por las ratas deprivadas de cobre (P) y normal *ad libitum* (C)

	D ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)	P ($\mu\text{g/g}$)	Anova (p)	Scheffe D/C	Scheffe D/P	C/P
Hígado Cobre	0,490 $\pm$ 0,130	16,210 $\pm$ 3,430	14,460 $\pm$ 4,180	0,0001	*	*	ns
Riñón Cobre	0,520 $\pm$ 0,150	1,330 $\pm$ 0,180	1,280 $\pm$ 0,190	0,0001	*	*	ns
Cerebro Cobre	0,117 $\pm$ 0,034	1,500 $\pm$ 0,178	1,431 $\pm$ 0,186	0,0001	*	*	ns
Corazón Cobre	0,583 $\pm$ 0,167	2,461 $\pm$ 0,400	2,222 $\pm$ 0,356	0,0001	*	*	ns

* significativo al 99%.

Figura 3: Microfotografía de un corte histológico frontal de tórax neonatal que pasa por un plano coincidente con el ductus arterioso (DA), emergencia de las arterias pulmonares (AP) y cayado aórtico (Ao). La foto superior corresponde a un recién nacido del grupo cu-prodeficiente en donde se distingue la amplia luz de DA. En la foto inferior, control, se observa un aspecto del ductus contraído (40x).

la pared y la luz, sólo de los ductus encontrados permeables en los tres grupos, mostrando que el grosor de la pared ductal era significativamente inferior en los ductus permeables del grupo cu-prodeficiente, que en aquellos también permeables de los grupos control y alimentación pareada, siendo similar en todos ellos el diámetro de la luz.

Discusión

En situación fisiológica, el ductus de las ratas se cierra espontáneamente dentro de los primeros 180 minutos de vida postnatal²⁵, lo que se asocia con cambios estructurales que comienzan a los 60 minutos²⁶. En nuestro caso los neonatos fueron estudiados entre las tres y doce horas de vida, lo que ha permitido, por una parte, consignar las manifestaciones clínicas de interés tras algunas horas de observación y, por otra, observar si ocurre el cierre del conducto o, al menos, aparición de evidencias de que pudiera ocurrir. En estas circunstancias bastaría la confirmación de la permeabilidad del ductus para considerarla un hecho patológico. El análisis morfométrico, basado en los procedimientos utilizados por Hörnblad²⁷, de aquellos ductus que persistieron permeables tanto del grupo deprivado de cobre como en los otros dos, permitió reforzar las primeras impresiones, con la identificación de diferencias morfológicas significativas en el grosor de pared de conductos igualmente permeables. A pesar de que la pared del ductus es pobre en fibras de colágeno

Tabla 2

Grosor de la pared y luz (μm , $\bar{x} \pm \text{DE}$) del ductus en ratas recién nacidas provenientes de madres con dietas *ad libitum* deficiente de cobre (P), normal pareada en calorías a la ingerida por ratas deprivadas de cobre (P) y normal *ad libitum* (C)

	D (n: 10) $\bar{x} \pm \text{DE}$	C (n: 2) $\bar{x} \pm \text{DE}$	P (n: 4) $\bar{x} \pm \text{DE}$	p*
Pared	69,1 $\pm$ 17,8	117,6 $\pm$ 1,4	96,3 $\pm$ 5,7	0,0079
Luz	274,5 $\pm$ 84,0	215,3 $\pm$ 97,7	252,8 $\pm$ 26,2	0,5304

* p según prueba de Kruskal Wallis.

y elastina²⁸, es probable que la disminución de su grosor esté en relación con desestructuración y disminución de ellas, fruto de la menor actividad de la enzima cuprodependiente lisiloxidasa. Esto, sin embargo, no explica totalmente que el ductus persistiera abierto en el grupo deficiente en cobre, dado que el cierre, en condiciones fisiológicas, parece depender principalmente de la contracción de la musculatura lisa de la túnica media^{25, 28}.

Se sabe que las variaciones de las concentraciones sanguíneas de prostaglandinas (PG) y oxígeno tienen un importante papel en el cierre fisiológico del ductus²⁹⁻³². Mientras las prostaglandinas de clase E tienen propiedades relajadoras del ductus, la $F_2-\alpha$ es la única con propiedades constrictoras³³, si bien es cierto que a esta última se la ha desestimado en el mecanismo de cierre fisiológico. Trabajos en preparaciones tisulares han evidenciado importante participación del cobre en la regulación de la síntesis de prostaglandinas, con potente efecto inhibidor sobre la de E_2 , a la vez que estimulador en la de $F_2-\alpha$. Se ha sugerido que el metal actuaría a través de la inactivación de la enzima endoperoxido- E_2 isomerasa, con activación concomitante de la endoperoxido- $F_2-\alpha$ -reductasa³⁴. Este hecho tiene enorme importancia si consideramos que a las PG E_2 y PG $F_2-\alpha$ se les conocen efectos contrapuestos sobre la musculatura del ductus. Es probable que en nuestros neonatos la deficiencia de cobre haya anulado la regulación propuesta por los autores antes mencionados, evitando en parte que se produzca la disminución fisiológica de la PG E_2 o el aumento de la PG $F_2-\alpha$ o ambos.

El déficit de cobre provoca en el corazón una miocardiopatía, que podría guardar relación con alguna alteración en el metabolismo energético

y, además de modificaciones estructurales, puede causar trastornos electrofisiológicos³⁵ y mecánicos³⁶, no siendo posible descartar la probabilidad de que ellos también puedan ocurrir en la musculatura ductal, con efectos negativos sobre su contractilidad. Esto adquiere especial relevancia si consideramos la hipótesis propuesta por Fay³⁷, que atribuye el papel constrictor del oxígeno a una estimulación de la síntesis de ATP. Finalmente, la deficiencia de cobre afecta la integridad estructural del pulmón³⁸, alterando de esta forma la función de intercambio gaseoso, evitándose una adecuada oxigenación de los tejidos.

Concluimos que la cuprodeficiencia efectivamente tiene un papel importante en el cierre del ductus arterioso en el recién nacido. El déficit de cobre, sobre la base de una alteración estructural de la pared del vaso, produciría una alteración en la regulación de la síntesis de prostaglandinas, un bajo aporte de oxígeno y una disminución de la capacidad de respuesta contráctil, que en conjunto determinarían que el ductus arterioso continúe permeable.

Resumen

Con el propósito de estudiar el efecto de la privación del cobre en la dieta sobre el cierre del ductus arterioso se estudiaron tres grupos de ratas hembras Sprague-Dowley de 10 animales cada uno. Al grupo I se le privó de dicho nutriente, al grupo II se le dio una dieta normal y al grupo III se le restringieron las calorías a la ingesta mostrada por las del primer grupo, pero con aporte normal de cobre, desde 35 días antes de la gestación y a lo largo de ésta, logrando un estado de deficiencia de cobre en las madres gestantes y la descendencia del primer grupo. Se

hicieron estudios morfométricos en 10 recién nacidos de cada grupo, uno de cada camada. En todos los recién nacidos del grupo cuprodeficiente (10/10), en 20% (2/10) del grupo control, y en 40% (4/10) del grupo de alimentación pareada, el ductus arterioso permaneció permeable, diferencias estadísticamente muy significativas de acuerdo a la prueba de Chi cuadrado ($p < 0,0009$). El grosor de la pared, considerando sólo los ductus que permanecieron permeables en los tres grupos, fue significativamente menor en los casos deprivados de cobre que los de los otros dos grupos (Kruskal-Wallis, $p = 0,0079$), mientras el diámetro de la luz era similar. La deficiencia de cobre maternofetal parece afectar significativamente el cierre espontáneo del ductus arterioso en la rata. El mecanismo por el cual esto ocurre podría incluir modificaciones estructurales de la pared del ductus, alteraciones en los procesos de obtención de energía o alteración en la regulación de la síntesis de prostaglandinas E_2 y $F_2 - \alpha$.

(Palabras claves: Cuprodeficiencia, ductus arterioso, ratas.)

Referencias

- Hart EB, Steenbock H, Wadell J et al.: Iron in nutrition VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin binding in the rat. *J Biol Chem* 1928; 77: 797-812.
- Sturgeon P, Brubaker C: Copper deficiency in infants. *Am J Dis Child* 1956; 92: 254-265.
- Karpel JT, Peden VH: Copper deficiency in long-term parenteral nutrition. *J Pediatr* 1972; 80: 32-36.
- Ashkenazi A, Levin ST, Djaldetti M, Fishel E, Benvenisti D: The syndrome of neonatal copper deficiency. *Pediatrics* 1973; 52: 525-533.
- Al-Rashid RA, Spangler J: Neonatal copper deficiency. *N Engl J Med* 1971; 285: 841-843.
- Heller RM, Kirchner SG, O'Neill JA et al.: Skeletal changes of copper deficiency in infant receiving prolonged total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1978; 92: 947-949.
- Sann L, David L, Galy G, Romand-Monier M: Copper deficiency and hypocalcemic rickets in a small for date infant. *Acta Paediatr Scand* 1978; 67: 303-307.
- Bennani-Smires CH, Medina J, Young LW: Radiological case of the month. *Am J Dis Child* 1980; 134: 1155-1156.
- Yuen P, Lin HJ, Hutchinson JH: Copper deficiency in a low birth weight infant. *Arch Dis Child* 1979; 54: 553-555.
- Rodríguez A, Soto G, Torres S, Venegas G, Castillo-Durán: Cinc y cobre en pelo y plasma de niños con diarrea crónica. *Acta Paediatr Scand* 1985; 2: 849-853.
- Chapman S: Child abuse or copper deficiency? A radiological view. *Br Med J* 1987; 294: 1370.
- Velin P, Dupont D, Daoud A: La carence nutritionnelle en cuivre. A propos d'une observation. *Ann Pediatr* 1989; 36: 269-274.
- Peterson CR: Osteogenesis imperfecta and other bone disorders in differential diagnosis of unexplained fractures. *Br Med J* 1990; 83: 72-74.
- Kelly WA, Kesterson JW, Carlton WW: Myocardial lesions in the offspring of female rats fed a copper deficient diet. *Exp Mol Pathol* 1974; 20: 405-406.
- Kopp SJ, Klevay LM, Felixik JM: Physiological and metabolic characterization of a cardiomyopathy induced by chronic copper deficiency. *Am J Physiol* 1983; 245: H855-866.
- O'Dell BL, Hardwick BC, Reynolds G, Savage JE: Connective tissue defect in chicks resulting from copper deficiency. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 108: 402-408.
- Carnes WH, Shields GS, Cardwright GE, Winrobe MM: Vascular lesions in copper-deficient swine. *Fed Proc* 1961; 20: 118 (abstr).
- Hill CHH, Starcher B, Kim CH: Role of copper in formation of elastin. *Fed Proc* 1967; 26: 129-133.
- Simpson ChS, Jones JE, Harms RH: Ultrastructure of aortic tissue in copper-deficient and control chick embryos. *J Nutr* 1967; 91: 283-291.
- Pinnell SR, Martin GR: The cross-linking of collagen and elastin; enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-aminoadipic-gamma-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Biochemistry* 1968; 61: 708-716.
- Sutton AM, Harvie A, Cockburn F, Farquharson J, Logan RW: Copper deficiency in the preterm infant of very low birthweight. Four cases and a reference range for plasma copper. *Arch Dis Child* 1985; 60: 644-651.
- American Institute of Nutrition: Report of the AIN ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1977; 107: 1340-1348.
- American Institute of Nutrition: Second Report of the AIN ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1980; 110: 1726.
- Stone SH: Method for obtaining venous blood from the orbital sinus of the rat or mouse. *Science* 1954; 119: 100.
- Janatova T, Jarkovska D, Hruša J, Samanek M, Ostadal B: Effect of the administration of prostaglandin ($PG E_2$) in the laboratory rat. *Physiol Bohemoslov* 1989; 38: 201-206.
- Jarkovska D, Janatova T, Hruša J, Ostadal B, Samanek M: The physiological closure of ductus arteriosus in the rat. An ultrastructural study. *Anat Embryol* 1989; 180: 497-504. (abstract).
- Hörnblad PY: Embryological observations of the Ductus Arteriosus in the guinea-pig, rabbit, rat and mouse. Studies on closure of the Ductus Arteriosus. IV. *Acta Physiol Scand* 1969; 76: 49-57.
- Olley PM, Coceani F: Mechanism of closure of the ductus arteriosus. En: Godman MJ, Marquis RM, eds. *Paediatric Cardiology. Heart disease in*

- the newborn. New York: Churchill Livingstone, 1979; 15-24.
29. Coceani F, Olley PM: The response of the ductus arteriosus to prostaglandins. *Canad J Physiol Pharm* 1973; 51: 220-225 (citado en Olley 1979).
 30. Sharpe GL, Thalme B, Larsson S: Studies on closure of the ductus arteriosus. XI Ductal closure *in utero* by a prostaglandin synthetase inhibitor. *Prostaglandins* 1974; 8: 363-368.
 31. Olley PM, Bodach E, Heaton J, Coceani F: Further evidence implicating E-Type prostaglandins in the patency of the lamb ductus arteriosus. *Eur J Pharm* 1975; 34: 247-250.
 32. Olley PM, Coceani F, Bodach E: E-Type prostaglandins. A new emergency therapy for certain cyanotic congenital heart malformations. *Circulation* 1976; 53: 728-731.
 33. Starling MB, Elliot RB: The effects of prostaglandins, prostaglandins inhibitors, and oxygen on the closure of the ductus arteriosus, pulmonary arteries and umbilical vessels *in vitro*. *Prostaglandins* 1974; 8: 187-203.
 34. Fujita T, Ohtani N, Aihara M, Nishioka K, Fujimoto Y: Comparison of the effects of Fe^{2+} and Cu^{2+} on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39: 230-233.
 35. Klevay LM, Viestenz KE: Abnormal electrocardiograms in rats deficient in copper. *Am J Physiol* 1981; 240: H185-199.
 36. Prohaska JR, Heller LJ: Mechanical properties of the copper-deficient rat heart. *J Nutr* 1982; 112: 2142-2150.
 37. Fay FS: Guinea Pig ductus arteriosus I. Cellular and metabolic basis for oxygen sensitivity. *Am J Physiol* 1971; 221: 470-479 (citado por Olley 1979).
 38. O'Dell BL, Kilburn KH, McKenzie WN, Thurston RJ: The lung of the copper-deficient rat. *Am J Pathol* 1978; 91: 413-423.