



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EVALUACIÓN DEL EFECTO TERATOGENICO DE LA
DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO INDUCIDA POR
METOTREXATE EN EL DESARROLLO DE CORAZÓN
EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN LA RATA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

TORRES MARTÍNEZ MARA BERENICE

DIRECTOR DE TESIS: DR. SEBASTIÁN MANUEL ARTEAGA
MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos los recursos que me ha proporcionado a lo largo de toda mi formación profesional, gracias por permitirme el honor de formar parte de sus egresados orgullosos de su raza y espíritu.

Agradezco los apoyos otorgados por el CONACyT a través de la beca número 172689.

De la misma forma agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado por otorgarme su valioso apoyo becario.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez agradezco el permiso de realizar esta tesis dentro de sus instalaciones y por el apoyo otorgado a través de el Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental y el Bioterio del Hospital.

A los integrantes de mi comité tutorial:

- Dr. Sebastián Manuel Arteaga Martínez, por su infinita paciencia, su valiosísima guía e invaluable conocimiento que me transmitió durante mis estudios y en la realización de esta tesis, además de ser el mejor ejemplo de trabajo y tenacidad.
- Dra. María Isabel García Peláez, por su insuperable guía, incondicional apoyo y consejo no solo durante la realización de esta tesis, sino en la vida misma.
- Dr, Enrique Pedernera Asteguiano, por sus importantes consejos y valiosos comentarios durante mis estudios para la elaboración de este proyecto e inmenso apoyo para concluir esta tesis.

A los miembros del jurado de examen de grado:

Dra. María del Carmen Méndez Herrera y Dra. Concepción Sánchez Gómez, por su valiosa revisión del manuscrito de tesis fundamental en la elaboración del texto final.

Agradezco a la Dra. Concepción Sánchez Gómez encargada del Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez permitirme realizar esta investigación en el departamento a su cargo y otorgarnos todas las facilidades.

A Oswaldo Aguirre Luna, Técnico Laboratorista del Hospital Infantil de México Federico Gómez por compartirme sus conocimientos en el manejo de los animales de laboratorio y otras técnicas, su valiosa colaboración fue fundamental durante los estudios de esta tesis.

Al Dr. MVZ. Miguel Ángel Martínez Castillo, su valioso apoyo durante los estudios realizados en el Bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez a su cargo, así mismo agradezco a todo el personal a su cargo que me apoyaron pacientemente con el manejo de las ratas gestantes y compartieron su amistad y valiosos tiempo ayudándome en algunas ocasiones más tiempo de el de su jornada diaria y durante muchos fines de semana.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez que participaron de una u otra forma en mis estudios durante mi estancia en el Laboratorio, agradezco su amistad e invaluable consejos, Marcela Salazar García, Mario Jáuregui Castro, Técnico en fotografía, Lucía Lima García, Técnica Laboratorista. A Alejandra Contreras Ramos, Investigadora del departamento, le agradezco que compartiera conmigo valiosos conocimientos y consejos, además de ser una gran amiga y una persona extraordinaria y a Zac Nichte Flores amiga admirable en tenacidad y perseverancia.

A Juan José Salazar Morales, Auxiliar de la oficina de Posgrado en Ciencias Biológicas en la Facultad de Medicina, que desde el primer día me orientó correcta y oportunamente, le agradezco el haber podido iniciar y finalizar este proyecto.

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez, por sus valiosos consejos y opinión en el análisis estadístico e impresión de las imágenes.

A todos mis profesores pilares fundamentales en mi formación profesional. Y a todos mis amigos y compañeros que compartieron conmigo este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios le doy gracia por darme una nueva oportunidad y permitirme ver el mundo con nuevos ojos. Por ponerme en este camino y guiarme en él, por darme fuerza para seguir y por muchas otras cosas más.

A mis Padres que son mi mejor ejemplo de lucha y perseverancia, les agradezco su inmenso amor, comprensión y por estar conmigo apoyarme siempre en los momentos más difíciles de mi vida. A mi madre, que con su amor infinito ha luchado arduamente por darnos lo mejor para que alcancemos nuestros sueños y hacer de nosotros mejores personas. A mi Padre que ha sido la guía más estricta del buen camino, por él puedo soñar en llegar muy lejos, por él sujeto a mis manos éste sueño.

A mis hermanos Oscar y Oswaldo que me alegran y animan todos los días, me impulsan a lograr nuevas metas y a ser mejor persona, les agradezco que aligeraran y compartieran mis noches de desvelo mientras escribía esta tesis. Agradezco a Oswaldo sus noches ayudándome a escribir mi estadística y a Oscar su ayuda en las traducciones de los incontables artículos.

Por que la vida me ha dado más hermanos, comparto este sueño con mis primos Yosimar, César y Omar; con mi única hermana e incondicional amiga Jazmin, que además de ser mi confidente, me ha animado e impulsado todos los días desde que la conozco y éste proyecto no fue la excepción.

A todos mis tíos, primos y amigos que han compartido conmigo alegrías y tristezas a lo largo de mi vida, les comparto de la alegría de este sueño.

**... y perdieron su sabiduría porque
habían olvidado de donde venía el
conocimiento ...**

Taylor Caldwell

INDICE

Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
Índice	vi
1. Resumen	1
1.1. Español	2
1.2. Summary	4
2. Introducción	6
2.1. Introducción	7
2.2. Justificación	9
2.3. Hipótesis	10
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos particulares	12
4. Antecedentes	13
4.1. Desarrollo embrionario y cardiovascular normal	14
4.1.1. Formación del asa cardiaca y cavidades cardiacas primitivas	19
4.1.2. Tabicación del corazón	23
4.1.2.1. Desarrollo y tabicación atrial	23
4.1.2.2. Tabicación atrioventricular	25
4.1.2.3. Desarrollo y tabicación de los ventrículos	27
4.1.2.4. Desarrollo y tabicación del tracto de salida	29
4.1.3. Incorporación del seno venoso y venas pulmonares a los atrios	32
4.1.4. Válvulas atrioventriculares y semilunares	34
4.1.5. Sistema de conducción del corazón	36
4.1.6. Inervación del corazón	36
4.1.7. Desarrollo vascular arterial	37
4.1.8. Desarrollo vascular venoso	39
4.1.9. Circulación cardiaca y cambios circulatorios al nacimiento	40
4.2. Ácido fólico	42
4.2.1. Estructura química del ácido fólico	42
4.2.2. Fuentes dietéticas y requerimientos	43
4.2.3. Absorción y distribución	44
4.2.4. Funciones metabólicas	44
4.2.5. Ácido Fólico y Embarazo	48
4.2.6. Deficiencias de ácido fólico, cuadro clínico y consecuencias de la deficiencia de ácido fólico	49
4.3. Metotrexate	52
4.3.1. Farmacocinética	52
4.3.2. Farmacodinamia	54
4.4. Defectos al nacimiento	59
4.4.1. MTHFR, ácido fólico, homocisteina y anomalías congénitas	61
4.4.2. Defectos del tubo neural	63
4.4.3. Cardiopatías congénitas	64

5. Metodología	67
5.1. Material y métodos	68
5.1.1. Material	68
5.1.1.1. Material biológico	68
5.1.1.2. Tamaño de la muestra	68
5.1.1.3. Reactivos y soluciones	68
5.1.1.4. Aparatos	68
5.1.1.5. Cristalería y material diverso	69
5.1.2. Método	69
5.1.2.1. Tipo de investigación	69
5.1.2.2. Criterios de selección	69
5.1.2.2.1. Criterios de inclusión	69
5.1.2.2.2. Criterios de exclusión	70
5.1.2.2.3. Criterios de eliminación	70
5.1.2.3. Variables	70
5.1.2.3.1. Independientes	70
5.1.2.3.2. Dependientes	70
5.1.2.4. Escalas de medición	70
5.1.2.5. Fecundación	70
5.1.2.6. Diseño experimental	71
5.1.2.7. Preparación de soluciones	72
5.1.2.8. Recolección de los fetos	72
5.1.2.9. Análisis de los fetos	72
5.1.2.10. Análisis estadístico	73
5.1.2.11. Consideraciones éticas	73
5.1.2.12. Consideraciones de bioseguridad	73
6. Resultados	75
6.1. Ratas madres	76
6.1.1. Peso total ganado	76
6.1.2. Alteraciones maternas	76
6.2. Fetos obtenidos	77
6.2.1. Frecuencias	77
6.2.1.1. Análisis de la Prueba T	78
6.2.1.2. Pruebas de Asociación	80
6.2.1.3. Prueba de ANOVA	81
6.2.2. Características fetales	82
6.2.2.1. Peso y talla	82
6.2.2.1.1. Análisis de la prueba T para peso y talla	82
6.2.2.1.2. Pruebas de Asociación para peso y talla	83
6.2.2.1.3. ANOVA para peso y talla	83
6.2.2.2. Alteraciones fetales externas	83
6.2.2.2.1. Prueba de χ^2 para sexo y alteraciones externas	84
6.2.2.3. Alteraciones fetales internas	86
6.2.2.3.1. Prueba de χ^2 para alteraciones internas	87
6.2.2.4. Cardiopatías congénitas	88
6.2.2.4.1. Prueba de χ^2 para cardiopatías congénitas	90
6.3. Tablas	92

6.4. Gráficas	101
6.5. Figuras y fotografías	107
7. Discusión	142
7.1. Patogenia	143
7.2. Alteraciones maternas	144
7.3. Análisis de la muestra obtenida	145
7.4. Alteraciones fetales	146
7.4.1. Peso y talla	147
7.4.2. Alteraciones externas y malformaciones	147
7.4.3. Alteraciones internas	151
7.4.4. Cardiopatías congénitas	152
7.5. Prevención del déficit de folatos y cardiopatías congénitas	157
8. Conclusiones	159
9. Bibliografía	161
10. Anexos	174

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Título:

EVALUACIÓN DEL EFECTO TERATOGÉNICO DE LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO INDUCIDA POR METOTREXATE EN EL DESARROLLO DE CORAZÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN LA RATA.

Antecedentes:

En México el 2 % de los nacidos vivos y el 11% de los nacidos muertos presentan una o más malformaciones externas; el 57.5% de los embriones y el 45.3% de los fetos abortados espontáneamente presentan dismorfismo. La deficiencia de ácido fólico está bien documentada como causante de defectos del tubo neural (DTN) y se ha propuesto como factor de riesgo para hendiduras faciales y cardiopatías congénitas. La deficiencia de ácido fólico (AF) o los antagonistas de esta vitamina originan deficiencia de folatos, esenciales en la síntesis de purinas, desoxitimidilato y metionina, dañando la síntesis de ADN, proliferación y crecimiento celular. El metotrexate (MTX) es un antagonista del ácido fólico que actúa inhibiendo a la reductasa dihidrofólica, su efecto es mayor en tejidos de proliferación intensa.

Justificación:

México tiene alta frecuencia en anencefalia y espina bífida en comparación con otros países. Dentro de las causas de los DTN se ha encontrado el déficit de ácido fólico que origina simultáneamente hiperhomocisteinemia, la cual tiene reconocido efecto teratogénico. La mutación del gen MTHFR C677T causa depleción de ácido fólico y alza de homocisteína. La población mexicana tiene alta incidencia en esta mutación. Además en México el 28% de las mujeres en edad fértil presentan deficiencia de ácido fólico y el 5% de Vitamina B₁₂. Las cardiopatías congénitas son la primera causa de mortalidad infantil en México. Su etiología es multifactorial y recientemente se ha asociado la deficiencia de ácido fólico e hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para cardiopatías congénitas, por lo que se propone desarrollar un modelo experimental que lo compruebe.

Objetivos

General: Estudiar las alteraciones cardiovasculares producidas por la deficiencia del ácido fólico, inducida por metotrexate, en un modelo experimental en fetos de rata.

Particulares: 1) Estudiar la frecuencia de cardiopatías congénitas en el modelo experimental propuesto. 2) Valorar el tipo de cardiopatías congénitas en los fetos de ratas.

Hipótesis

Si la deficiencia de ácido fólico origina defectos en el tubo neural en el hombre y en la rata, y es un factor de riesgo para cardiopatías congénitas en el hombre, entonces el uso de un antagonista del ácido fólico en la rata podrá producir cardiopatías congénitas en esta especie.

Método

Estudio experimental, ciego, prospectivo y transversal en ratas Wistar gestantes. Se distribuyeron aleatoriamente 55 ratas gestantes en 5 grupos: Control ambiental, control de

inyección (lío filizado de metotrexate), grupos experimentales 3, 4 y 5 que corresponden cada uno al grupo de inyección en el 9°, 12° y 15° día de gestación; a su vez cada grupo formó 3 subgrupos que corresponden a la administración de metotrexate intraperitoneal a dosis de 0.12, 0.25 y 0.5 mg/kg respectivamente. El día 21 de gestación mediante cesárea se obtuvieron los fetos, se valoraron externamente cualitativa y cuantitativamente, se obtuvo el bloque cardio-pulmonar para analizar el corazón y grandes vasos externamente, se hicieron cortes cuatro cámaras para analizar las estructuras internas, se midió con objetivo micrométrico las estructuras que lo ameritaron, se obtuvo registro fotográfico.

Análisis

Se utilizó la prueba de X^2 para variables no paramétricas y T de Student y ANOVA para las variables paramétricas. Correlaciones paramétricas y no paramétricas.

Resultados

Se obtuvieron 352 fetos vivos, 23 fetos muertos y 207 reabsorciones. De los fetos vivos 273 fueron normales y 81 presentaban alguna alteración externa. La prueba T mostró diferencias en el número de fetos vivos, fetos normales y peso total ganado de las madres en el grupo de 9°, 10° y 12° día. En la prueba de ANOVA no hubo diferencia a dosis de 0.12 mg/kg. A dosis de 0.5 hubo diferencia entre todos los grupos en el número de fetos vivos y en el número de fetos normales. El número de fetos anormales no mostró diferencias entre los grupos ni entre las dosis. Se encontraron 23% de alteraciones externas que consistieron en retardo del crecimiento intrauterino, edema, hipotrofia, hematomas, malformaciones tales como malformaciones de cabeza, DTN, cola, extremidades y columna vertebral. El 24.4% presentaron alteraciones internas, y estas fueron: líquido peritoneal, líquido pleuropericárdico, hemopericardio, hipoplasia pulmonar, alteraciones en páncreas y bazo y alteraciones genitourinarias como criptorquidia y riñón ectópico. Se encontró cardiopatía en el 16.2%, comunicación interatrial (CIA), comunicación interventricular (CIV), alteración de los vasos arteriales y/o venosos principales, anillo aórtico, coartación aórtica y tetralogía de Fallot. Del total de las cardiopatías la CIA fue la más frecuente, la CIV en segundo sitio y las alteraciones de vasos y alteraciones aórticas en tercer sitio y finalmente la tetralogía de Fallot. La razón de cardiopatías fue 1:5.

Conclusiones

El MTX es embrio y fetotóxico. El periodo de mayor susceptibilidad en la rata a la toxicidad por deficiencia de AF inducida por MTX fue en los días 9° y 10° del desarrollo prenatal y a dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg de MTX. La mayor frecuencia de malformaciones fue en el 9° día. Las malformaciones fueron más frecuentes cuando la exposición a la deficiencia fue más temprana en el desarrollo, mientras que las anomalías fueron más frecuentes en periodos más tardíos de la organogénesis. La deficiencia de ácido fólico es un factor de riesgo para desarrollar cardiopatías congénitas. La proporción obtenida de cardiopatías fue de 16% y se tiene una razón de 1 en 5. Este estudio aporta un modelo útil para la experimentación de los mecanismos de lesión producidos por el déficit de folatos.

2. SUMMARY

Title:

EVALUATION OF TERATOGENIC EFFECTS OF ACID FOLIC DEFICIENCY PROVOQUED BY METHOTREXATE IN HEART DEVELOPMENT IN A EXPERIMENTAL MODEL IN RAT.

Antecedents:

In México 2% of alive births and 11% of dead births have one or more external malformations; 57.5% of embryos and 45.3% of fetus spontaneously aborted present dysmorphism. The acid folic deficiency is well documented as cause of neural tube defects (NTD) and it would be considered as risk fact for facial clefts and congenital heart defects. The acid folic (AF) deficiency or the antagonists for this vitamin caused deficiency in essential folates for the purines, desoxythymidylate and methionine synthesis and damage the DNA synthesis, proliferation and the cellular growth. Methotrexate (MTX) is an acid folic antagonist that acts inhibiting the dihydrofolate reductase, its effect is more on quick proliferating tissues.

Justification:

Mexico has long frequency in anencephaly and spina bifida than other countries. Into NTD's causes is the acid folic deficit that provoques hyperhomocysteinemia simultaneously, whom has knowing teratogenic effect. MTHFR C677T mutation provoques depletion of acid folic and increment of homocysteine. The Mexican people have long incidence in this mutation. Furthermore in Mexico 28% of fertile-age women have acid folic deficiency and 5% have vitamin B₁₂ deficiency. The congenital heart defects are the first cause on the infantile mortality in Mexico. Its etiology is multifactorial and recently has been associated at acid folic deficiency and hyperhomocysteinemia as risk fact to congenital heart defects, therefore we propose develop a experimental model that check it.

Objective:

General: Study the congenital heart defects whom were caused by acid folic deficiency induced by methotrexate in a experimental model in rat's fetus.

Particulars: 1) Study the congenital heart defect's frequency in the experimental model proposed. 2) Evaluate the congenital heart defect's type in the rat's fetus.

Hypothesis.

If the acid folic deficiency provoques neural tube defects in the human and the rat and it's a risk fact in the congenital heart defects, the using of acid folic antagonist in the rat will produce congenital heart defects in this specie.

Method:

Experimental study, blind, prospective, transversal in pregnant Wistar rats. 55 rats were distributed at random in 5 groups: environmental control, injection control (methotrexate liquid), experimental groups 3, 4 & 5, each corresponds to the injection on the 9th, 10th & 12th pregnant day, simultaneously each group formed 3 subgroups that correspond at the methotrexate administrated by intraperitoneal via at 0.12, 0.25 y 0.5 mg/kg dose. At 21th

pregnancy day by cesarea the fetus were obtained, we valorated them externally qualitative and quantitative, we got the cardiopulmonary block & analized externally the heart and great arteries, we made cuts in four cameras in order to analized the internal structures, and we measure with micrometric objective the structures that are needed, we obtained photographic register.

Analysis:

We used de X^2 Test for no parametric variables and student T and ANOVA for parametric variables. Parametrics and no parametrics correlations.

Results:

We obtained 352 alive fetus, 23 dead fetus and 207 reabsortions. Out of the alive fetus 273 were normal fetus and 81 presented some external alteration. The student Test showed differences in the alive fetus number, normal life fetus number and in the weigth win mother in the groups 9th, 10th, 12th day. In the ANOVA test there weren't different at 0.12 mg/kg dose. At 0.5 mg/kg there were differences between all the groups in the alive fetus and normal fetus number. The anormal fetus number didn't show differences between the groups nor the dose. Founded 23% external alterations, those consisted in leasting of growth, edema, hypotrophy, hematome, malformations such as head, NTD, limb, vertebral and tail malformations. 24.4% were internal alterations, those were peritoneal, pleuropericardic and hemopericardic liquid, hypoplastic lung, pancreatic and splenic alterations, genitourinary alterations as criptorquidia and ectopic kidney. Founded 16.2% of congenital heart defects, as atrial septal defects, ventricular septal defects, veins and great arteries alterations, aortic ring, coarctation of aorta and tetralogy of Fallot. Out of total of cardiopatias, the atrial septal defects was the first, the ventricular septal defects was the second and the vessels and aortic alterations were the third place and the tetralogy of Fallot was de fourth. The ratio was 1:5.

Conclusion:

MTX is embryo and fetotoxic. The most susceptible period in the rat at the toxicity by acid folic deficiency induced by MTX was in the 9th and 10th prenatal development day and at dose of 0.25 and 0.5 mg/kg. The most malformation's frecueny was in 9th day. The malformations were more frequent when the exposition were more early in the development, and the anormalities were more frequent in later organogenesis periods. The deficiency of acid folic is a risk fact for develop congenital heart defects. The proportion obtained of cardiopatias was 16% and a ratio 1:5. This study gives a useful model for damage mechanisms experimentation produces by folates deficit.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de programas de salud pública apropiados los países desarrollados han disminuido la mortalidad infantil causada por infecciones, bajo peso o desnutrición y han sido reemplazadas por las malformaciones congénitas, colocándose dentro de las primeras causas de mortalidad infantil. México se encuentra en esta transición, ha reportado en los últimos años valores similares de prevalencia de malformaciones en recién nacidos.

En México, aproximadamente 1 de cada 50 nacidos vivos (2%) y uno de cada nueve nacidos muertos (11%) presenta una o varias malformaciones externas mayores o menores (Mutchinick et al., 1988; Mutchinick, 1996). En los abortos espontáneos se ha reportado que el 57.5% de los embriones y el 45.3 % de los fetos presentan dismorfismo (Arteaga et al., 2001).

En un estudio realizado en México en nacidos vivos, se reportó una incidencia de malformaciones externas de 18.88:1000; de esta incidencia, corresponde 14.78:1000 nacidos vivos con malformaciones simples y 4.10:1000 nacidos vivos con malformaciones múltiples, ambos con mayor prevalencia en el sexo masculino (Mutchinick et al, 1988; Mutchinick, 1996). Los nacidos vivos con malformaciones múltiples presentaron un promedio de 3.2 malformaciones por recién nacido afectado, y los nacidos con intersexo presentaron en promedio 4.8 malformaciones. Sobresalen las malformaciones osteomusculares, de piel, oído y del sistema nervioso central (Mutchinick et al., 1988; Mutchinick, 1996).

En los nacidos muertos aumentó la incidencia significativamente a 128.52:1000 nacidos muertos, 89.02:1000 nacidos muertos con malformaciones simples y 39.5:1000 nacidos muertos con malformaciones múltiples, con un promedio de 4.2 malformaciones por cada nacido muerto. El sexo femenino es dos veces más frecuentemente afectado, sin embargo tiene mayores afecciones el sexo masculino. Las afecciones principales son las del sistema nervioso central, de 8 a 35 veces más frecuente que en los nacidos vivos. En comparación con otros países México tiene alta frecuencia en anencefalia y espina bífida (Mutchinick et al., 1988; Mutchinick, 1996).

En los abortos espontáneos las malformaciones más frecuentemente encontradas son: hendiduras faciales, defectos del tubo neural y/o de la pared abdominal, displasia ectodérmica, malformaciones de manos, defectos de la línea media, displasias óseas y fenotipo Turner. Los abortos espontáneos con malformaciones no tipificadas son alteraciones múltiples y malformaciones craneofaciales (Arteaga et al., 2001).

En la década de los 50's, el incremento en la presencia de malformaciones orientó sobre el peligro potencial de algunos medicamentos y otros teratógenos ambientales en el desarrollo humano (Mutchinick et al., 1988; Guizar, 1994; Mutchinick, 1996; Carlson, 2005). Las deficiencias nutricionales no habían sido consideradas un factor importante y en poco tiempo la deficiencia de ácido fólico, así como los fármacos que originan dicha deficiencia demostraron ser importantes causas de malformaciones. Actualmente los factores ambientales teratogénicos son múltiples; por ejemplo se sabe que los agentes antineoplásicos son altamente teratogénicos por ser inhibidores de las células con división rápida, y entre ellos están los antagonistas del ácido fólico que originan serias alteraciones en el metabolismo de esta vitamina (Wenstrom et al., 2001; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El déficit de ácido fólico produce múltiples alteraciones del desarrollo; varios estudios muestran alta asociación con defectos del tubo neural y se ha propuesto como factor de riesgo en presencia de cardiopatías congénitas (Mutchinick et al., 1988; Rose y Mennuti, 1995; Mutchinick, 1996; Ruiz et al., 1996; Hall y Solehdin, 1998; Hernández et al., 2000).

Las cardiopatías congénitas son alteraciones morfológicas o funcionales de corazón y/o grandes vasos presentes desde el nacimiento. Tienen una incidencia de seis a ocho por cada 1000 nacidos vivos (Sánchez, 1986; Espino-Vela, 1988; Nora et al., 1991); desafortunadamente en México no existen registros precisos. Las cardiopatías congénitas son la causa de muerte número uno en el primer año de vida en países desarrollados. En México entre el 20 y 50% de los recién nacidos con cardiopatía mueren en el primer año de la vida (Bobadilla, 1987).

Entre las cardiopatías congénitas más frecuentes, están la comunicación interventricular, el conducto arterioso persistente (más frecuente en México), la tetralogía de Fallot, la estenosis aórtica, la estenosis pulmonar, la comunicación interauricular y la transposición

de grandes vasos, entre otras (Quero-Jiménez, 1981; Sánchez, 1986; Bobadilla, 1987; Espino-Vela, 1988; Attié et al., 1993).

Se considera que el 90% de las cardiopatías son de origen multifactorial y aún no se ha aclarado su etiología. Existen dos grupos etiológicos: intrínsecos y extrínsecos, los intrínsecos son genéticos y los extrínsecos son infecciosos, químicos, físicos, alcoholismo, diabetes mellitus, tabaquismo, entre otros (Sánchez, 1986; Guizar, 1994; Thompson et al., 1996).

Las deficiencias del ácido fólico están bien documentadas como causantes de defectos del tubo neural en el humano y en modelos experimentales; recientemente se ha considerado la deficiencia del ácido fólico como factor de riesgo para cardiopatías congénitas, sin embargo, no existen estudios experimentales en mamíferos que sustenten esta aseveración (Rose y Mennuti, 1995; Hall y Solehdin, 1998; Hernández et al., 2000).

2.2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el folato interviene en diversas vías metabólicas esenciales para las células y que las deficiencias en estas vías metabólicas se asocian a múltiples enfermedades, entre las que se encuentran las malformaciones congénitas, principalmente los defectos del tubo neural, y más recientemente sobre tejidos derivados de crestas neurales como algunas regiones en corazón y grandes vasos. En general los defectos del tubo neural presentan elevada incidencia y se ha señalado que la suplementación con altas dosis de ácido fólico disminuye dicha incidencia (Mutchinick, 1996; Mutchinick, 1988).

México presenta una incidencia de malformaciones congénitas externas similar a los países desarrollados, tanto en los nacidos vivos (2%) como en los nacidos muertos (10%) (Mutchinick, 1988). Las afecciones principales en los nacidos muertos son las del sistema nervioso central, de 8 a 35 veces más frecuente que en los nacidos vivos. En comparación con otros países, México tiene alta frecuencia en anencefalia y espina bífida (Mutchinick, 1988; Mutchinick, 1996; Ruiz, 1996).

Varios estudios han buscado la causa de los defectos del tubo neural asociados a la deficiencia de ácido fólico, encontrando que la hiperhomocisteinemia tiene efecto teratogénico; asimismo, se han encontrado mutaciones, entre las que destaca la mutación del gen de la MTHFR C677T que origina hiperhomocisteinemia y reducción del ácido fólico plasmático. Dentro de las poblaciones que presentan alta incidencia de la mutación del gen de la MTHFR C677T se encuentra la de los mexicanos. Sin embargo, la trascendencia de la mutación como causa de malformaciones congénitas aún es controversial (Mills, 1995; Kirke, 1996; Rosenquist, 1996; Botto, 2000b; Johanning, 2000; Martínez, 2001).

Junto a la gran frecuencia de mutación del gen MTHFR C677T, en un estudio realizado en la Ciudad de México, se reportó que el 28% de las mujeres en edad reproductiva estudiadas presentaban deficiencia de ácido fólico y 5.1% deficiencia de vitamina B₁₂ (Casanueva, 2000).

Por otro lado, en México mueren durante el primer año de vida entre el 20 y 50% de los recién nacidos con cardiopatía. Es la causa número uno de mortalidad infantil. En el humano se ha asociado la hiperhomocisteinemia secundaria a deficiencia de ácido fólico a

cardiopatías congénitas por lo que se considera actualmente como factor de riesgo (Bobadilla, 1987; Kapusta, 1999; Wenstrom, 2001).

Los estudios experimentales en los que se ha asociado deficiencia de ácido fólico y cardiopatías congénitas han sido realizados en aves, por lo tanto, se propone realizar un modelo experimental en mamíferos que explique los mecanismos por los que el déficit de ácido fólico produce cardiopatías congénitas.

2.3. HIPÓTESIS

Si la deficiencia de ácido fólico origina defectos en el tubo neural en el hombre y en la rata, y es un factor de riesgo para cardiopatías congénitas en el hombre, entonces el uso de un antagonista del ácido fólico en la rata podrá producir cardiopatías congénitas en esta especie.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las alteraciones cardiovasculares producidas por la deficiencia del ácido fólico, inducida por metotrexate, en un modelo experimental en fetos de rata.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la frecuencia de cardiopatías congénitas en el modelo experimental propuesto.
- Valorar el tipo de cardiopatías congénitas en los fetos de ratas.

4. ANTECEDENTES

4. ANTECEDENTES

4.1. DESARROLLO EMBRIONARIO Y CARDIOVASCULAR NORMAL

El desarrollo de los seres humanos es de gran interés y se origina a partir de la necesidad de conocer nuestros orígenes, comprender mejor el desarrollo de diversas patologías, así como de mejorar la calidad de vida. El desarrollo humano inicia con la fecundación, formando una célula especializada: el cigoto, que crecerá, se dividirá y finalmente formará un organismo maduro. Sin embargo, el proceso por el cual a partir de una célula se origina un organismo multicelular es asombroso y en múltiples aspectos desconocido.

El desarrollo de un ser vivo se presenta por etapas. La mayor parte de los cambios se manifiestan en los periodos embrionario y fetal, debido a que el desarrollo prenatal es más acelerado y las células se encuentran en división rápida y muestran cambios más destacados. Así, los diversos cambios a lo largo de la vida determinarán la adaptación o no del organismo al medio, ya sea intrauterino o extrauterino (Moore y Persaud, 2004), por ello lo que ocurre en esta fase de la vida es decisiva para etapas posteriores.

Uno de los órganos cuyo desarrollo temprano determina la supervivencia del producto de la concepción es el corazón. En el hombre entre los días 21 y 23 de gestación, antes de que se haya completado la fusión de los primordios cardíacos, comienza a contraerse el corazón; de esta manera se asegura la sobrevivencia del embrión al distribuir oportunamente gases y nutrientes, así como la eliminación de desechos. El desarrollo cardíaco se establece con una serie de eventos entre los que destacan la torsión del asa y la división en cámaras por la septación; en el hombre esta serie de sucesos ocurre entre la 3^o y 6^o semanas del desarrollo, siendo el sistema cardiovascular el primer sistema en alcanzar madurez funcional (Arteaga et al., 1987). En la rata el desarrollo del corazón sigue la misma secuencia de eventos para formar un corazón tetracavitario con pocas diferencias anatómicas con respecto del hombre. La fusión de los primordios miocárdicos en la rata sucede al día 9, la torsión del asa entre el día 9 y 10, aparecen los esbozos septales de las cuatro cavidades y del tracto de salida en el día 12 y termina la tabicación hacia el día 16, por lo que el periodo crítico de morfogénesis cardíaca en la rata va del día 9 al día 16 (Sissman, 1970; Van Praagh et al., 1980; Carlson, 2005).

El desarrollo cardíaco es complejo debido a que el corazón deriva de varias estirpes celulares: del mesodermo esplácnico, del mesodermo cefálico paraxial y de células de la cresta neural craneal. El mesodermo esplácnico forma el armazón inicial del tubo cardíaco y origina el tejido endomiocárdico auricular y ventricular. El mesodermo cefálico paraxial y lateral de la región de la placoda ótica intervienen en el desarrollo de los componentes endoteliales del tracto de salida, en la pared del tracto de salida intervienen las células de la cresta neural, principalmente la situada entre la placoda ótica y la tercera somita (de la Cruz et al., 1977; García-Peláez y Arteaga, 1993; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005), sumado a mecanismos complejos como la apoptosis, proliferación celular, diferenciación, migración celular y crecimiento diferencial (Fishman y Chien, 1997; Carlson, 2005).

Las células de la cresta neural se localizan a lo largo de los bordes laterales de la placa neural. Son de origen neuroepitelial modificadas a células con características mesenquimatosas, lo que les permite migrar a distintas regiones y diferenciarse en diversas estructuras. La cresta neural craneal es un componente importante del polo cefálico, éstas células migran mucho tiempo antes de la fusión de los pliegues neurales (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las crestas neurales tienen dos papeles importantes en el diseño cardiovascular; el primero en el desarrollo de los arcos faríngeos incluyendo el arco aórtico que formará las grandes arterias del tórax donde formarán el músculo liso de la túnica media de las arterias; el segundo en la formación del septo del tracto de salida. Las células de la cresta neural preótica migran al 1° y 2° arco faríngeo, las de la región postótica presomítica migran al 2° y 3° arco faríngeo y al endotelio de la aorta dorsal; las de la región somítica entre la 1° y 2° somita occipital migran al 3° y 4° arco faríngeo y al tracto de salida; las células entre la 3° y 4° somita occipital migran al tracto de salida y al 4° y 6° arco aórtico; ambas vías bilaterales invaden la gelatina cardíaca del tracto de salida y siguen el patrón de migración marcado por la cresta perifaríngea. En la parte posterior de la faringe, la cresta perifaríngea pasa por detrás del sexto arco faríngeo (en forma de S) marcando el límite entre las células de las crestas craneales y las del tronco. Además indica la vía de migración de las células entéricas de la cresta neural craneal hacia el intestino y las células cardíacas de la cresta neural craneal hacia el tronco-cono del corazón, por lo que una alteración en estas

estructuras produciría defectos de septación (Fukiishi y Morriss, 1992; Kirby y Waldo, 1995; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

La serotonina juega un papel importante en la migración y diferenciación de las células de la cresta neural y su actividad morfogénica es regulada por su transporte; el RNAm del receptor de serotonina se ha detectado en las células de la cresta neural y en los tejidos derivados de éstas. Se ha observado en estudios *in vitro* que la serotonina modula la migración del mesénquima palatino, craneofacial, cardíaco, muscular liso vascular y endotelial aórtico. Se ha detectado serotonina en el miocardio adyacente de los cojines endocárdicos mediando la inhibición de la migración del mesénquima endocárdico. Se ha observado un proceso similar en el mesénquima craneofacial y se han logrado producir malformaciones craneofaciales y cardíacas con la exposición a inhibidores de la serotonina (Hasson et al., 1999).

La apoptosis es un tipo de muerte celular, mecanismo universal por el cual células son eliminadas para mantener la homeostasis de los cambios celulares. Este proceso es regulado bioquímica y genéticamente; diferentes moléculas están involucradas en la regulación y determinación de las células apoptóticas, así como las mitocondrias actúan como sensores de estrés para detectar señales del medio que lleven a apoptosis a la célula (Amarante-Méndez y Green, 1999). En el desarrollo del corazón la apoptosis juega un papel importante en la morfogénesis y remodelación tisular al coordinarse con la proliferación celular. Es evidente la apoptosis en el corazón durante el desarrollo y rotación del tracto de salida, en la trabeculación de los ventrículos, septación atrial, válvulas cardíacas, sistema de conducción, vasculatura coronaria, regresión de vasos, entre otras. Las fuerzas físicas, hemodinamia, factores de crecimiento, la matriz extracelular y puntos específicos de producción de óxido nítrico se consideran reguladores de la muerte celular vascular. Además se ha sugerido que en las cardiopatías congénitas se pueden presentar algunas alteraciones en los procesos apoptóticos, estimulándolos o disminuyéndolos (Fisher et al., 2000). La apoptosis incluye la regulación de la transcripción de genes y de activación molecular para activar procesos de destrucción celular, por ejemplo, ciertos tipos de daño al DNA (Huang et al., 1999).

El desarrollo embrionario inicia con la fecundación formando una célula especializada: el cigoto, que inicia inmediatamente la segmentación. El embrión de 12 a 16 blastómeras se denomina mórula. Cuando en la mórula se introduce líquido entre las células internas hasta formar una cavidad, el embrión es llamado blastocisto (Figura 1A). En la segunda semana se organiza el embrión bilaminar (Figura 1B). En la tercera semana sucede la gastrulación, formándose el embrión trilaminar; al final de esta semana inicia la neurulación (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El sistema vascular inicia su desarrollo a mediados de la tercera semana de gestación cuando se incrementan importantemente los requerimientos nutritivos del embrión. Las futuras células cardiacas se encuentran en el epiblasto y migran a través de la línea primitiva formando una zona de mesodermo engrosado en forma de media luna localizado rostralmente al disco embrionario en gastrulación; con la delaminación del mesodermo lateral las células cardiacas se localizan en la hoja esplácnica del mesodermo lateral craneal a la notocorda, los pliegues neurales y membrana bucofaringea y se extiende hacia atrás a ambos lados del intestino anterior formando la placa cardiogénica (mesodermo esplácnico precardiaco) (Figura 1C) (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

La localización de la placa está determinada por inducción del endodermo. El endodermo craneal produce señales que inducen sobre el mesodermo esplácnico suprayacente la formación de la región precordial mediante la activación del factor de transcripción NKX2.5. La expresión de este factor de transcripción requiere de la coexistencia de los inhibidores de los genes WNT en medialuna en la mitad anterior del endodermo y en la lámina lateral del mesodermo, así como la secreción de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP) 2 y 4 en la porción posterior de la línea primitiva y la periferia del embrión; esta combinación induce la expresión del NKX2.5 en la región lateral del mesodermo lateral en su hoja esplácnica, factor responsable de la inducción cardiaca (Moore y Persaud, 2004; Sadler, 2004; Carlson, 2005).

El mesodermo esplácnico precardiaco se engruesa para formar el manto miocárdico (primordio miocárdico). Las células del mesodermo esplácnico entre el manto miocárdico y el endodermo del intestino anterior forman islotes sanguíneos (cúmulos angiogénicos) que se conectan entre si para formar un plexo capilar, que en su porción caudal se continúa con

el plexo vitelino, cardinal y umbilical. Finalmente los vasos del plexo capilar endocárdico se fusionan para formar los dos primordios endocárdicos tubulares o tubos endocárdicos primitivos (que formarán el revestimiento interno del corazón) envueltos en el manto miocárdico.

Los tubos endocárdicos primitivos bilaterales (primordios mio-endocárdicos) se localizan inicialmente craneales a la membrana bucofaríngea y posteriormente caudales a la membrana bucofaríngea en posición ventrolateral a la faringe primitiva. Este cambio de posición es debido a que con el cierre del tubo neural y la formación de las vesículas cerebrales que crecen rápidamente en dirección cefálica, se extienden sobre la región cardiaca y traccionan la membrana bucofaríngea favoreciendo los plegamientos. En el día 22 ± 1 (horizonte X de Streeter) el embrión se flexiona y con el plegamiento lateral y ventral del embrión se forman el intestino anterior, el pedículo del saco vitelino y el área cardiaca gira casi 180° , situándose primero en la región cervical y finalmente en el tórax (Figura 1C). Simultáneamente (por el plegamiento ventral) se van acercando hasta unirse en la línea media por delante del intestino para formar un tubo endocárdico primitivo recto, se fusionan en dirección cráneo-caudal a la altura del bulbus cordis o futuros ventrículos (Figura 1D).

La fusión de los esbozos continua caudalmente constituyendo el tubo cardiaco primitivo. Cada cámara cardiaca definitiva se forma por la integración de diferentes segmentos cardiacos que aparecen secuencialmente en el desarrollo cardiaco, por lo que cabe aclarar que esta primera etapa del corazón tubular solo se encuentran la porción proximal del bulbus cordis y el ventrículo primitivo (Figura 1E) (Arteaga et al., 1987).

El miocardio se origina de células del primordio miocárdico, formando cardiomiocitos en desarrollo con un patrón característico de miofibrillas. Mientras tanto, el miocardio se va engrosando y secreta una gruesa capa de matriz extracelular abundante en colágena, glicoproteínas y mucopolisacáridos, principalmente ácido hialurónico, llamada gelatina cardiaca o de Davis. El tubo cardiaco está formado entonces por una capa endocárdica interna rodeada por una gruesa capa de gelatina cardiaca y enseguida el miocardio. Esta etapa del desarrollo es conocida como “corazón en tubo recto” o “etapa pre-asa” (Arteaga et al., 1987).

Además del área cardiogénica, los islotes sanguíneos por proceso de vasculogénesis forman vasos sanguíneos en todo el mesodermo. Los islotes sanguíneos laterales a la región cardiogénica forman dos tubos paralelos cercanos a la línea media formando dos vasos longitudinales llamados aortas dorsales. Los tubos endocárdicos en su porción craneal se anastomosan a través de arcos vasculares incurvados (arcos aórticos) alrededor de la faringe con las aortas dorsales que se originan del mesodermo embrionario. La porción caudal de los tubos no se fusiona, se expande formando el tracto venoso de entrada y se anastomosa con las venas umbilicales (alantoideas), cardinales comunes y vitelinas (onfalomesentéricas) que atraviesan el septo transversal y que derivan de los islotes sanguíneos del mesodermo esplácnico extraembrionario del saco vitelino.

El espacio entre las dos láminas del mesodermo lateral formará la cavidad pericárdica, el tubo cardíaco en desarrollo sobresale gradualmente a la cavidad manteniéndose unido por la parte dorsal a través de un pliegue de mesodermo, el mesocardio dorsal; éste desaparece gradualmente durante la etapa de asa, quedando el corazón suspendido en la cavidad, fijo sólo en los polos craneal y caudal (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Hacia el día 21 ó 22, la diferenciación cardíaca es suficiente para que el corazón comience a latir (horizonte X de Streeter) y se presenta flujo sanguíneo peristáltico en el horizonte XI.

4.1.1. Formación del asa cardíaca y cavidades cardíacas primitivas

Al final de la tercera semana el corazón es simétrico, pero enseguida el tubo cardíaco se alarga y comienza doblarse hacia la derecha para formar el asa bulboventricular o asa en “C” (embrión de 7 somitas); el día 23 la parte cefálica se pliega en dirección ventral-caudal, hacia delante y a la derecha, quedando la convexidad del asa a la derecha y adelante y la concavidad a la izquierda y atrás, es decir el bulbus cordis se localiza a la derecha y el ventrículo primitivo a su izquierda, mientras que la porción auricular lo hace en dirección dorso-craneal y a la izquierda dejando el surco A-V a la izquierda del ventrículo primitivo (Figura 1E). La torsión ocurre en el embrión de 8 a 12 somitas, formando el asa cardíaca completa a los 28 días (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las causas que determinan la torsión del asa aún no son claras y se han involucrado diferentes factores. Los factores de transcripción Nkx-2, MEF-2 y d-HAND/e-HAND participan en la formación del asa cardíaca. El primer indicador de la asimetría cardíaca es la expresión diferencial del factor de transcripción e-Hand, (inicialmente en ambos lados) en el lado izquierdo del tubo cardíaco; el d-Hand se expresa principalmente en el primordio del ventrículo derecho, estas moléculas pueden ser importantes en la interpretación de señales moleculares asimétricas y por lo tanto sobre la expresión celular resultando la formación del asa cardíaca. Se han encontrado otros factores de asimetría en el asa cardíaca, por ejemplo la localización asimétrica de los haces de actina, la presión diferencial de la gelatina cardíaca, el crecimiento diferencial entre las regiones del tubo cardíaco, la redistribución y los cambios morfológicos en las células miocárdicas. Parece que la orientación del tubo cardíaco está determinada desde la gastrulación, por los 3 ejes embrionarios: anteroposterior, dorsoventral y derecho-izquierdo (D-I), este último es el que determina la orientación del asa cardíaca, sin embargo una alteración en el eje dorsoanterior (suma del eje dorsoventral y anteroposterior), resulta en la pérdida de la orientación D-I, por lo que la coordinación de los 3 ejes es determinante en la orientación de las diferentes estructuras corporales asimétricas, como el corazón. Las células que migran desde el nodo primitivo (que forman la notocorda y las células de la placa del piso del tubo neural) regulan el eje dorsoanterior; la primera asimetría aparece en el nodo con la expresión asimétrica de genes, lo que lleva a un patrón asimétrico en la expresión de genes de las siguientes líneas celulares. Las células de la línea media dorsal (notocorda y placa del piso) son esenciales en la orientación D-I en el desarrollo temprano del corazón hasta que desencadenan la orientación D-I sobre el corazón. Parece que el control molecular del eje D-I también regula la expresión asimétrica del gen BMP-4 en el tubo cardíaco y participa en la torsión del asa (Yost, 1998; Chen et al., 1997; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En el estadio de asa en “C” se agregan dos segmentos al bulbus y el ventrículo: estos son el cono o tracto de salida primitivo y el atrio primitivo (de la Cruz et al., 1977; Arteaga et al., 1987; García-Peláez y Arteaga, 1993). La torsión del corazón aumenta progresivamente y con el plegamiento se rompe el mesenterio dorsal liberando la mayor parte del corazón.

Con la formación tardía del asa cardiaca (etapa post-asa) el corazón adquiere una forma de “S”; el tracto de salida está formado por el bulbus cordis, representado por la rama craneal del asa y la rama media del asa representa a la porción ventricular, en la que el ventrículo derecho está más cercano al tracto de salida y el ventrículo izquierdo está más próximo a la aurícula; la rama caudal representa a la porción atrial (Figura 1E). El tracto de salida se conecta exclusivamente con la región trabeculada apical derecha y el atrio primitivo se conecta a través del canal atrioventricular con la región trabeculada izquierda (de la Cruz et al., 1977; Arteaga et al., 1987).

Mientras se forma el asa se producen expansiones en la longitud del tubo cardiaco, principalmente en el bulbus cordis y los atrios, modificando la relación entre los segmentos cardiacos. La porción atrial (tracto de entrada) que inicialmente se situaba por fuera de la cavidad pericárdica formando una aurícula común localizada en posición caudal, asciende gradualmente a una posición cefálica y dorsal al ventrículo y termina colocándose dorsal al tracto de salida; al final de la etapa de post-asa, esta aurícula única se ensancha hacia ambos lados del tracto de salida dejando una depresión media sobre la que descansa el tronco arterioso y se conecta con ambos ventrículos (Figura 1E).

La unión atrio-ventricular es la porción más estrecha del tubo cardiaco y forma el canal atrio-ventricular, conectando el atrio con el ventrículo primitivo. El miocardio del canal atrioventricular queda dentro del vestíbulo atrial al desarrollarse la unión atrioventricular fibrosa. La unión entre el ventrículo y el bulbo cardiaco está señalada por el surco bulboventricular (o interventricular derecho e izquierdo). Con la rotación del asa cardiaca el surco interventricular izquierdo queda ventral y el surco derecho queda dorsal entre la parte cefálica de ambos surcos; separando las paredes mediales del bulbus cordis y el ventrículo izquierdo se forma un pliegue denominado infundíbulo-ventricular (espolón conoventricular o bulboventricular), el cual corresponde a la curvatura interna del asa y participa delimitando la porción trabecular entre ambos ventrículos. Internamente se encuentra el orificio interventricular primario, donde se desarrolla una cresta de miocardio que separa las bolsas trabeculadas de los ventrículos y que formará parte del tabique interventricular. El ventrículo primitivo formará la porción trabeculada del ventrículo izquierdo y la porción de entrada de ambos ventrículos. El bulbus tiene dos porciones, la porción proximal del bulbo formará la porción trabeculada del ventrículo derecho, mientras

que la porción distal del bulbo cardiaco carece de trabeculaciones y se estrecha formando la porción media denominada como arterial que dará origen a los infundíbulos o tractos de salida de los ventrículos; la parte distal del bulbo se continua insensiblemente constituyendo el tronco arterioso, segmento que se incorpora durante la etapa de post-asa (24-26±1 día), al reunirse el mesodermo esplácnico y el mesénquima perifaríngeo. Este segmento se bifurca en su porción más cefálica, llamada saco aórtico, donde se forman las aortas ventrales que se conectan con el sistema de los arcos aórticos; el tronco arterioso originará las raíces y la porción proximal de las grandes arterias, e interviene en la formación de los anillos valvulares aórtico y pulmonar, en los infundíbulos ventriculares y en la tabicación interventricular (Arteaga et al., 1987).

Al finalizar la formación del asa (embrión de 12 a 14 somitas, Horizonte XI), el endocardio forma extensas placas engrosadas, que a finales del Horizonte XI e inicios del XII presentan hundimientos irregulares, las trabéculas endoteliales, que invaden el miocardio subyacente y forman oquedades irregulares cubiertas de endocardio donde entra la luz de la cavidad. El tubo desarrolla bolsas trabeculadas distal (caudal) y proximal (cranial) al agujero interventricular primario. El ventrículo primitivo, ya trabeculado, recibe el nombre de ventrículo izquierdo primitivo y el tercio proximal trabeculado del bulbo cardiaco se denomina ventrículo derecho primitivo.

La ubicación final de las masas ventriculares está determinada por la orientación del asa bulboventricular; si el asa se pliega a la derecha el ventrículo morfológicamente derecho se colocará a la derecha, pero si el tubo cardiaco se pliega hacia la izquierda el ventrículo morfológicamente derecho quedará situado en el lado izquierdo. La colocación del asa también determina el tipo de conexión atrioventricular, el asa a la derecha permitirá una conexión concordante, mientras que un asa izquierda formará una conexión discordante o una conexión concordante si los atrios están en situs inversus.

El epicardio aparece en la etapa de post-asa, deriva del primordio proepicárdico localizado cerca del mesocardio dorsal de la región derecha del seno venoso; estas células mesoteliales migran, deslizándose sobre el miocardio y cubriendo el corazón para formar el tejido conectivo del epicardio y las arterias y venas coronarias. El epicardio expresa la 4-integrina

que permite la adhesión del epicardio al miocardio al unirse a la VCAM-1 del miocardio. (Carlson, 2005) .

Es hasta esta etapa cuando las cuatro cavidades cardíacas primitivas están presentes y el corazón adquiere externamente su apariencia tetracavitaria aunque aún no esté completamente tabicado (Figura 1E) (Arteaga et al., 1987).

4.1.2. Tabicación del corazón

La tabicación sucede entre el 26° y 36° día del desarrollo del embrión. El corazón externamente tiene su apariencia casi definitiva, el seno venoso se localiza dorsal al atrio común en su porción derecha. La tabicación se inicia formando dos masas de tejido que se aproximan entre sí y dividen el interior del corazón en dos canales, derecho e izquierdo. La formación de este tejido depende de la síntesis y depósito de matriz extracelular y proliferación celular. La gelatina cardíaca proyecta engrosamientos hacia la luz del corazón, es más gruesa en la pared cefálica del atrio y en la región interatrial hasta la porción atrioventricular. En la zona trabeculada de los ventrículos es delgada y se va engrosando desde la unión interatrial hasta la zona infundíbulo troncal, cerca de los arcos aórticos. El miocardio forma un pliegue en la región interventricular como consecuencia del surco interventricular y no como una proyección de la gelatina cardíaca. La capa mioendocárdica de la porción dorsal es delgada y gruesa en la ventrocefálica. Las partes donde aparecen los esbozos la gelatina cardíaca se concentra y es invadida por tejido mesenquimatoso laxo altamente especializado, formando el tejido endocárdico o almohadillas. Estas masas celulares se forman en el canal atrioventricular y en la región troncoconal, convergiendo los tabiques interatrial, interventricular troncoconal, y válvulas atrio-ventriculares. La división de las cavidades del corazón sucede en procesos simultáneos, aunque se describen por separado a continuación.

4.1.2.1. Desarrollo y tabicación atrial

Los atrios definitivos se forman de los atrios primitivos y de una porción venosa. El atrio primitivo derecho originará el atrio derecho y el atrio primitivo izquierdo el izquierdo. Al

final de la cuarta semana (28 ± 1 día) cuando el atrio está en posición dorso-cefálica al ventrículo, entre el foramen sinoatrial y la vena pulmonar primitiva y a nivel de la depresión media en la pared craneal del atrio común, crece una cresta en forma de media luna llamada septum primum. Este septum formado por una delgada capa de miocardio de la pared dorso-cefálica del atrio, desciende en dirección a las almohadillas endocárdicas del canal atrio-ventricular; los extremos de la media luna se fusionan a los cojines endocárdicos y el orificio que se forma entre el borde libre del septum y las almohadillas se denomina ostium (foramen) primum interatrial. Antes de que se complete el cierre del ostium primum, se producen perforaciones por muerte celular programada en la porción craneal y dorsal del septum primum; gradualmente el ostium primum se fusiona con las almohadillas obliterando la comunicación (35 ± 1 día). Mientras esto último sucede, las perforaciones craneales confluyen y forman el ostium secundum interatrial ($31-35 \pm 1$ día), manteniendo la comunicación entre los atrios (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Al ampliarse la cavidad auricular derecha y poco después de la formación del ostium secundum, aparece entre la valva izquierda del seno venoso y a la derecha del septum primum un segundo septum llamado septum secundum (37 ± 1 día). Este tabique, en forma de media luna, crece parcialmente extendiéndose desde la parte cráneo-dorsal del atrio hasta el tabique del canal atrioventricular. Este septo crece principalmente por sus astas que se dirigen hacia la desembocadura de la futura vena cava inferior y finalmente se fusionan las astas entre sí y con los cojines (43 ± 1 día). Su borde libre cóncavo se superpone ocluyendo el ostium secundum. El orificio que delimita el septum secundum en su borde libre es el foramen (agujero) oval (Figura 1F) (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

La posición del foramen oval permite que casi toda la sangre que entra en el atrio derecho pase desde la vena cava inferior directamente a lado izquierdo a través del foramen oval y el ostium secundum. El septum primum es un tabique delgado, fácilmente depresible y funciona como la válvula del agujero oval permitiendo el paso del flujo sanguíneo del atrio derecho al izquierdo y no en sentido contrario (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Debido a que el atrio derecho recibe todo el volumen sanguíneo y el desarrollo pulmonar es tardío, aunado al deficiente transporte de los vasos sanguíneos pulmonares, se dificulta el manejo adecuado de la carga sanguínea, lo que condicionaría un esfuerzo importante para la circulación pulmonar si no pudiera desviar la circulación y equilibrar el volumen sanguíneo, mientras que el lado izquierdo si no recibiera la carga del lado derecho no bombearía sangre suficiente para favorecer el desarrollo normal de las estructuras izquierdas. Sin embargo, no todo el volumen sanguíneo es desviado, con el movimiento de la válvula del foramen oval gran parte pasa al ventrículo derecho y después al tracto de salida pulmonar, para el correcto desarrollo del lado derecho, pero la mayor parte del volumen que pasa por el ventrículo derecho no puede ingresar a la circulación pulmonar y es desviado hacia la aorta descendente por el conducto arterioso (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.2.2. Tabicación atrioventricular

El canal atrioventricular es la región que formará los vestíbulos atriales y la unión fibrosa atrioventricular donde están fijadas las valvas de las válvulas atrioventriculares. Al final de la 4ª semana (28 ± 1 día) en el borde ventrosuperior y dorsoinferior del canal atrioventricular aparecen como rebordes de mesénquima, las almohadillas (cojines) endocárdicas atrioventriculares ventral y dorsal. Los cojines endocárdicos funcionan como válvulas primitivas que ayudan a impulsar la sangre hacia delante. En estos engrosamientos la gelatina cardiaca organizada como una membrana basal gruesa es la que se dirige al interior del canal atrioventricular y se continúa imperceptiblemente con los esbozos del septo atrial y ventricular. Algunas células del endocardio en respuesta a una acción inductora del miocardio subyacente pierden sus características epiteliales y se transforman en células mesenquimatosas que migran hacia la gelatina cardiaca. Las células miocárdicas adyacentes sintetizan adherones (complejo molecular de proteoglicanos, fibronectina y proteínas de la matriz) que se colocan debajo de las células endocárdicas determinadas e inducen la transformación del epitelio y la invasión a la gelatina cardiaca. En la invasión de la gelatina cardiaca por las células endocárdicas atrioventriculares también interviene la acción del TGF- β 1 y TGF- β 3, sin estos se inactiva la transformación celular. Los

segmentos del endocardio que se transforman en células mesenquimatosas expresan el gen Msx-1 y HOX-7 que les permite responder a la inducción por parte de los adherones del miocardio. Las células endocárdicas contienen las moléculas de adhesión N-CAM en la superficie, sin embargo las células que se transforman en mesenquimatosas disminuyen la producción de N-CAM, lo que facilita su conversión a células móviles (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005). Las células mesenquimatosas que se localizan en la gelatina cardiaca de esta región del canal atrioventricular sintetizan proteasas que destruyen los adherones y estabilizan la morfología de la región de los cojines endocárdicos, que terminarán por convertirse en tejido conectivo denso. Las células endocárdicas atriales y ventriculares no pierden sus características epiteliales, ni expresan Msx-1 ni HOX-7 y no migran a la gelatina cardiaca.

Las almohadillas crecen hacia el canal hasta fusionarse completamente en dirección atrioventricular, desapareciendo el endocardio en la zona de fusión (Horizonte XV-XVI) y separan parcialmente el atrio del ventrículo y dividen al canal atrioventricular en un canal derecho e izquierdo (Figura 1F) (de la Cruz et al., 1983; García-Peláez et al., 1984).

En los bordes laterales de cada uno de los cojines ya fusionados se forman dos protuberancias una derecha y una izquierda, llamados tubérculos derecho e izquierdo de los cojines atrioventriculares; el izquierdo se proyecta al canal atrioventricular izquierdo y el tubérculo derecho se proyecta al canal derecho. En las partes laterales de cada canal se desarrolla un cojín más pequeño denominado cojín lateral, que se proyecta hacia la luz estrechándola y adquiere una forma de herradura (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El aparato valvular (valvas y estructuras de fijación) derivan de los cojines atrioventriculares y del miocardio de la masa ventricular, pero no están asociadas con la región trabecular apical. El cojín dorsoinferior del canal atrioventricular da origen a las porciones dorsales de los septos interatrial e interventricular; el cojín ventrosuperior lo hace en el extremo ventral y se une al extremo ventricular de la cresta sinistroventral del cono, este cojín se remodela formando una concavidad dirigida hacia la izquierda. El cojín dorsoinferior se curva hacia la derecha, y su tubérculo derecho queda más bajo que el izquierdo; del tubérculo derecho se forma la valva septal de la tricúspide y del izquierdo se forma parte de la valva aórtica de la mitral. Esta diferencia de nivel entre los tubérculos es

lo que determina la diferencia de nivel de inserción entre la valva septal de la tricúspide y la valva aórtica de la mitral, además de la existencia del septum atrioventricular que separa el atrio derecho del ventrículo izquierdo (de la Cruz et al., 1983; García-Peláez et al., 1984). La válvula tricúspide está formada siempre dentro del ventrículo morfológicamente derecho y la válvula mitral dentro del ventrículo morfológicamente izquierdo.

4.1.2.3. Desarrollo y tabicación de los ventrículos

Los ventrículos definitivos se originan de diferentes regiones del tubo cardiaco, formando las tres porciones de los ventrículos definitivos: tracto de entrada, porción trabeculada y tracto de salida.

Al final de la 4ª semana, los dos ventrículos primitivos se expanden por crecimiento del miocardio y forman divertículos y trabéculas en el interior (Figura 1F y 2A). La porción de entrada de ambos ventrículos se forma de la porción dorso-inferior del ventrículo primitivo. En esta porción el proceso de diverticulización y trabeculación forma los aparatos valvulares atrioventriculares. Como se señaló previamente la porción trabeculada del ventrículo derecho se forma de la porción proximal del bulbus cordis, más cefálico que el ventrículo primitivo. La posición entre los ventrículos está determinada por el desarrollo del asa bulboventricular, quedando finalmente la porción trabeculada derecha a la derecha y ligeramente anterior a la porción trabecular izquierda (Arteaga et al., 1987).

Las porciones ventriculares tienen cavidades pequeñas con paredes gruesas, formadas principalmente por gelatina cardiaca y una capa compacta de miocardio. Esta capa comienza a formar espacios dirigidos hacia la cavidad, y el endocardio se invagina y cubre estos espacios. Este proceso, llamado diverticulización, es el encargado de la trabeculación de los ventrículos. Este proceso en el miocardio es por inducción del endocardio, que secreta neuregulina, un factor de crecimiento. Durante este proceso va desapareciendo la gelatina cardiaca en las bolsas trabeculadas y permanece en mayor cantidad a nivel del canal atrioventricular y del segmento cono-truncal.

La formación del septum interventricular depende del proceso de diverticulización. En la 4ª semana (26-28±1 día), en la pared interna en el vértice del ventrículo común, entre las

bolsas trabeculadas de la región bulboventricular, se forma una cresta miocárdica mayor que las demás trabéculas, es el esbozo del tabique interventricular muscular que crece hacia las almohadillas endocárdicas atrioventriculares; externamente el tabique está marcado por el surco interventricular (Figura 2A).

Las bolsas trabeculares realizan un crecimiento centrífugo, que les permite acercarse y unirse en sus paredes apico-mediales, situándose por debajo del esbozo del septo interventricular. La fusión de las trabéculas aumenta importantemente el tamaño del tabique. Los excavamientos de las trabéculas del miocardio de las paredes del tabique aumentan su tamaño, sumado a un crecimiento del pliegue de las paredes de los ventrículos. El crecimiento lateral del tabique está determinado por la aposición progresiva de las trabéculas de miocardio y determina las características específicas de los ventrículos (Figura 2A). La porción dorsal del tabique interventricular se dirige a los cojines endocárdicos atrioventriculares, mientras que el extremo ventral se dirige al infundíbulo. El extremo dorsal del borde libre del tabique se continúa con el cojín dorso-inferior del canal atrioventricular y el extremo ventral se continúa con el cojín ventro-superior del canal atrioventricular y con la cresta sinistroversal del cono. El tabique junto con los cojines atrioventriculares separan la porción de entrada y trabecular de ambos ventrículos.

El cojín atrioventricular ventro-superior contribuye en la formación del infundíbulo ventricular izquierdo, en la pared postero-lateral del infundíbulo del ventrículo izquierdo (en la base de la porción libre de la valva mitral antero-septal, la continuidad mitro-aórtica) y en la pared ántero-medial del infundíbulo izquierdo (superficie izquierda de la porción basal anterior del tabique interventricular). El espacio que deja el borde libre del tabique interventricular, las almohadillas endocárdicas y el pliegue infundíbulo-ventricular es el orificio interventricular primario (bulboventricular) (García-Peláez et al., 1984).

Con la fusión de los cojines atrioventriculares, la incorporación del cono a los ventrículos y el abocamiento del cono postero-medial al ventrículo izquierdo, el orificio interventricular primario cambia su ubicación para formar el vestíbulo aórtico, la nueva comunicación que se forma es el orificio interventricular secundario. Los límites de este orificio son: céfalo-dorsalmente el tubérculo derecho del cojín dorso-inferior del canal atrioventricular (septo de entrada ventricular), céfalo-ventralmente está el cojín ventro-superior del canal

atrioventricular y la cresta sinistroventral del cono (septo de salida ventricular) y caudalmente el tabique interventricular.

El cojín dorso-inferior del canal atrioventricular y el extremo dorsal del tabique interventricular cierran progresivamente la parte dorsoinferior el orificio interventricular secundario; la parte ventro-superior se cierra por las crestas conotruncales ya fusionadas.

El cierre del orificio interventricular secundario se concreta por la unión del tejido conectivo de las almohadillas endocárdicas, las crestas cono-truncales y el tabique interventricular formando la porción membranosa el tabique interventricular, que durante la etapa fetal es muscular y hacia el final de la gestación e inicio de la vida postnatal se torna fibroso (Arteaga et al., 1987).

4.1.2.4. Desarrollo y tabicación del tracto de salida

La porción de salida de los ventrículos se origina principalmente de la segmento distal del bulbus cordis, aunque también participan el tronco arterioso y el canal atrioventricular.

Inicialmente el bulbus cordis es un tubo con una capa gruesa de gelatina cardiaca cubierto por una capa de miocardio compacto. En la 5ª semana (Horizonte XIV, 29±1 día), la gelatina cardiaca se remodela formando unos engrosamientos mesenquimatosos, las almohadillas o crestas. En el tronco arterioso se forman un par de crestas y otro par en la región del cono (infundíbulo). Las crestas del cono o infundíbulo se desarrollan a lo largo de todo este segmento y están localizadas una frente a la otra: una es sinistroventral y la otra dextrodorsal, dividen al cono en una porción ántero-lateral y una pósteromedial.

Las crestas del cono crecen para fusionarse entre sí y longitudinalmente para unirse con las crestas del tronco. Con el crecimiento longitudinal, la cresta dextrodorsal del cono se continua con la cresta izquierda del tronco y la cresta conal sinistroventral con la derecha del tronco. En su extremo inferior la cresta sinistroventral del cono se une a la parte ventral del tabique interventricular primitivo, adhiriéndose de este modo al extremo ventricular del cojín ventro-superior del canal atrioventricular. La cresta dextrodorsal del cono se continúa con el borde anterior-derecho del canal atrioventricular. Al fusionarse entre sí dividen al cono en una porción ántero-lateral o infundíbulo del ventrículo derecho que se continúa con

la porción izquierda del tronco, y una porción póstero-medial o infundíbulo del ventrículo izquierdo que continúa con la porción derecha del tronco (Figura 2B) (Arteaga et al., 1987).

La cresta sinistroversal del cono también participa en la formación del septo interventricular de salida y en el cuerpo de la trabécula septomarginalis. Las crestas conales y troncales participan en la formación de la cresta supraventricularis y en el cierre de la comunicación interventricular durante la incorporación cono-truncal al ventrículo. La fusión de las crestas conales y troncales origina las crestas tronco-conales espirales de aproximadamente 180°, que dividen al tronco-cono en dos canales entrelazados, la aorta y el tronco de la arteria pulmonar (Figura 2B).

Las crestas del tronco son una superior-derecha y una inferior-izquierda; dividen al tronco en una porción derecha y una izquierda. Por su extremo distal se continúan con las astas del septo aórtico-pulmonar, recién formado en el saco aórtico-pulmonar. La cresta superior se continua con el asta superoizquierda y la cresta inferior se continua con el asta inferoderecha, determinando su conexión con los arcos aórticos, el tronco derecho con el 4° arco y la izquierda con el 6° arco aórtico.

El saco aórtico-pulmonar que se encuentra distal al tracto de salida participa en la formación de la aorta ascendente y el tronco de la arteria pulmonar. El saco aórtico-pulmonar no tiene crestas y la partición del tracto de salida y fusión de las crestas troncales es desde la pared dorsal de la raíz aórtica ventral entre el 4° y 6° arco aórtico hasta los ventrículos (septo aortopulmonar de Tandler) (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El saco aórtico-pulmonar o aorta ventral es un ensanchamiento que comunica el origen de los arcos aórticos con el tronco arterioso, queda incluido en el mesénquima de los arcos faríngeos. En el día 31±1, entre el 4° y 6° arcos aórticos se desarrolla una cresta en forma de media luna con una asta superior-izquierda y una asta inferior derecha, denominado septo aórtico-pulmonar. El septo crece en la dirección al tronco hasta fusionarse con las crestas del tronco; la disposición del septum aórtico-pulmonar es el que determina la comunicación entre la aorta y la arteria pulmonar con los respectivos arcos aórticos. La mayor parte de las grandes arterias se origina de las paredes del saco aórtico y de su septo, y el tronco arterioso sólo forma la porción proximal de las grandes arterias.

De esta forma, la aorta y la pulmonar mantienen comunicación con los arcos aórticos: la aorta con el 4° arco aórtico (que esta anterior y derecho) y el tronco de la pulmonar se continúa con los 6° arcos aórticos para formar las ramas de la pulmonar. Por la espiral que forma del tabique tronco-conal, el canal aórtico sale anterior derecho, pero en su base a nivel del bulbus es posterior izquierdo; mientras que el canal pulmonar sale posterior izquierdo y en el bulbus es anterior derecho, por lo que ambos canales se entrelazan en su trayecto (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En el horizonte XVI se desplazan los infundíbulos en dirección de derecha a izquierda y ligeramente de adelante hacia atrás, con lo que se incorpora el infundíbulo aórtico al ventrículo izquierdo. Con el desplazamiento de los infundíbulos el tabique infundibular ocluye el foramen ventricular progresivamente hasta cerrarlo totalmente en el Horizonte XVIII donde convergen fusionándose el borde inferior del tabique infundibular con el borde derecho de la cresta del tabique ventricular y la porción derecha del pliegue infundíbulo-ventricular y dorsalmente con la porción derecha de los cojines atrioventriculares. La correcta septación del tracto de salida depende de la concurrencia del proceso de encajamiento y la tabicación, ya que el cono necesita estar en posición y alineación correcta para hacer coincidir las tres estructuras y tabicar correctamente el tracto de salida cardiaco. Este sitio de fusión es el septo membranoso interventricular (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Todas estas crestas están formadas del mesénquima derivado de células de la cresta neural craneal que migran desde la región del rombencéfalo posterior (rombómeras 6-8) a los arcos faríngeos 3, 4 y 6 y posteriormente a las crestas cono-truncales (almohadillas conales y troncales), contribuyendo a la formación de las crestas del cono y el tronco, y en la formación de los ganglios parasimpáticos cardiacos. También influyen en el desarrollo miocárdico. Las alteraciones en la migración originan malformaciones de esta región del corazón y por ello no es raro ver anomalías relacionadas con alteraciones en el desarrollo cráneo-facial.

Las células derivadas de la cresta neural de la pared del tracto de salida producen fibras elásticas que dan la elasticidad a la aorta y grandes vasos, elasticidad que va disminuyendo gradualmente hasta las ramas arteriales aórticas. El miocardio en la porción superior de los

infundíbulos tiene escasa diverticulización dando el aspecto casi liso de la porción de salida ventricular.

En el extremo proximal de septo troncal aparecen 4 engrosamientos que formarán 2 de las 3 sigmoideas de la aorta y la arteria pulmonar (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.3. Incorporación del seno venoso y venas pulmonares a los atrios

A mediados de la cuarta semana el corazón tubular es simétrico, bilateral y recibe sangre de tres pares de venas: las venas vitelinas u onfalomesentérica, las venas umbilicales o alantoideas y las venas cardinales comunes, a través de la prolongación sinusal derecha e izquierda (senos venosos primitivos). Con la formación del asa, los dos senos venosos dejan el septo transversal y se incorporan a la cavidad pericárdica y se colocan dorsocaudal a los atrios; durante la etapa de post-asa, ambos senos se fusionan formando la porción transversal del seno venoso y dejan sus extremos separados, que son denominados cuernos derecho e izquierdo (conductos de Cuvier). A cada cuerno desemboca una vena vitelina, umbilical y cardinal. Inicialmente el seno es simétrico y se conecta con la cara dorso-medial del atrio a nivel de la porción transversal por el foramen sinoatrial (Figura 2C). Este foramen está delimitado externamente por dos surcos sinoatriales (derecho e izquierdo) e internamente por dos pliegues: las valvas derecha e izquierda del seno venoso. La comunicación entre el seno venoso y el atrio es amplia, pero con la torsión y tabicación, la entrada del seno venoso se desplaza hacia la derecha. Previamente a la tabicación atrial, el pliegue sinoatrial izquierdo se profundiza hacia la derecha y dirige al foramen sinoatrial a la derecha desplazando el flujo sanguíneo a este lado; esto favorece un mayor desarrollo del cuerno derecho, y la conexión de la porción transversal del seno venoso se desplaza al atrio derecho e inicia una asimetría lateralizada a la derecha del seno venoso. En la 5ª semana se oblitera la vena umbilical derecha y la vena vitelina izquierda por la formación del ductus venoso (canal hepatocardiaco) que desemboca en la vena vitelina derecha. En la 10ª semana desaparece la porción proximal de la vena umbilical izquierda y se oblitera la vena cardinal común izquierda, por la desviación hacia la cardinal anterior derecha a través de la vena innominada. Debido a las modificaciones del sistema venoso, el cuerno izquierdo

diminuye de tamaño y lo que queda del seno venoso izquierdo es la porción transversa y su cuerno proximal que forman el seno venoso coronario y la vena oblicua de la aurícula izquierda (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

La porción derecha aumenta de calibre al recibir toda la circulación venosa y constituye la comunicación del seno venoso con el atrio. El cuerno derecho al aumentar su calibre cambia de posición horizontal a vertical y se incorpora al atrio derecho para formar la pared lisa (o sinusal) de ésta (Figura 9). La porción lateral del atrio se expande hacia delante para formar la orejuela derecha. La desembocadura del seno venoso está limitada por un par de pliegues, las válvulas venosas derecha e izquierda que se fusionan en dirección dorso-craneal y forman el septum spurium. Al incorporarse el seno venoso, la válvula izquierda y el septum spurium se fusionan con el septum secundum del tabique de la pared auricular. De la valva derecha sólo persiste la porción inferior formando la válvula de la vena cava inferior (válvula de Eustaquio) y la válvula del seno coronario (válvula de Tebesio). La cresta terminal forma la división entre la porción trabeculada del atrio derecho y la porción lisa originada del seno venoso. Las válvulas venosas ayudan a orientar el flujo sanguíneo de la vena cava inferior hacia el foramen oval y hacia el atrio izquierdo, mientras que la sangre proveniente de la cava superior y del seno coronario pasa al ventrículo derecho (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En el embrión humano de 25-27 días, horizonte XII de Streeter, aparece el esbozo pulmonar en el piso de la faringe. Del mesénquima circundante al esbozo pulmonar se forman los angioblastos que formarán el plexo pulmonar. Simultáneamente en la aurícula izquierda se desarrolla una vena pulmonar primitiva o embrionaria única, como evaginación de la pared posterior del atrio izquierdo, a la izquierda del septum primum (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En el horizonte XIII (27-29 días) el plexo en formación rodea los esbozos pulmonares, bronquios e intestino. La porción cefálica drena hacia el 6° arco aórtico, la porción caudal drena hacia el plexo esplácnico y dorsalmente se conecta con las venas cardinales. La vena pulmonar crece hacia el plexo pulmonar pero aun no se une a él, por lo que la sangre circula a través del plexo esplácnico. En el horizonte XIV (29-30 días) la vena pulmonar se canaliza y se conecta con el plexo pulmonar; el plexo se separa parcialmente del plexo

esplácnico, así como la red vascular del esófago de la de los esbozos traqueopulmonares. En el horizonte XV (30-32 días) la vena pulmonar ya recibe sangre que drena del plexo pulmonar. Entre el horizonte XVI a XVIII (31-37 días) el plexo pulmonar pierde todas sus conexiones con el plexo esplácnico excepto por las venas brónquicas. Las ramas de la vena pulmonar se incorporan al atrio izquierdo originando la pared lisa del atrio izquierdo con la entrada de cuatro venas pulmonares. La conexión del plexo pulmonar en sus etapas iniciales con las cardinales y el sistema umbilicovitellino, primordios de la vena cava superior, vena ácigos, seno coronario, vena innominada izquierda, cava izquierda (si persiste), porción proximal de las venas subclavias, vena porta, venas gástricas, pancreáticas, ducto venoso y vena cava inferior explica las conexiones anómalas de las venas pulmonares a estas venas, ya que inicialmente la vascularización de los pulmones no se conecta directamente al corazón sino a través de dichas venas (Figura 2C y 2D).

4.1.4. Válvulas atrioventriculares y semilunares

Las válvulas atrioventriculares derivan de los cojines atrioventriculares pero principalmente de las paredes ventriculares por delaminación del miocardio. El aparato músculo-tendinoso se origina del miocardio ventricular por diverticulación y socavamiento para formar las bolsas trabeculadas ventriculares. Es decir, con la fusión de las almohadillas endocárdicas, cada orificio atrioventricular está rodeado de proliferaciones de tejido mesenquimático. El tejido de la superficie ventricular se excava y adelgaza a causa de la corriente sanguínea formando válvulas (faldón miocárdico) que quedan unidas a la pared ventricular por medio de cordones musculares; este proceso sucede en dirección caudo-cefálica, las porciones caudales permanecen como los músculos papilares, mientras que el tejido muscular de las porciones cefálicas degenera y es reemplazado por tejido conectivo denso para formar las cuerdas tendinosas.

Los anillos valvulares atrioventriculares y las hojas valvulares o velos valvulares (valvas) parecen provenir tanto del tejidos de los cojines que rodea a los orificios atrioventriculares como de una invaginación del tejido superficial del epicardio del surco atrioventricular.

El anillo atrioventricular derecho o tricuspideo se forma del cojín lateral derecho, del dorso-inferior del canal atrioventricular y por la cresta dextrodorsal del cono. El anillo atrio-

ventricular izquierdo o mitral se forma de los cojines lateral izquierdo, dorsoinferior y ventrosuperior del canal atrioventricular. Las válvulas consisten en tejido conectivo cubierto de endocardio, unido a trabéculas de los ventrículos, a través de los músculos papilares y las cuerdas tendinosas. El desarrollo de las válvulas de los canales atrioventriculares forma del lado derecho la válvula tricúspide (tres valvas) y del lado izquierdo la válvula mitral (dos valvas) (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Entre la base del cono (donde se forman los cojines del cono) y el extremo caudal del tronco arterioso se forman dos juegos de válvulas semilunares, a partir de seis engrosamientos de mesénquima gelatinoso.

Los primordios de las válvulas semilunares se forman durante la septación truncal. Cuatro se advierten como tubérculos de las crestas del tronco formando dos pares de eminencias, uno en el lado aórtico y el otro en el lado pulmonar; estos pares de eminencias se forman durante la fusión de las crestas truncales entre sí. Frente a las tumefacciones de las crestas del tronco aparece un tercer tubérculo en ambos canales proveniente de la pared del tronco, el reborde troncal menor (dorsal y ventral) o cresta intercalar. En este momento están formadas por mesénquima sólido, en forma piramidal de base superior. Los engrosamientos crecen hacia la luz y se excavan en su cara superior entre el esbozo y la pared del vaso formando las valvas de la válvula (senos de Valsalva). El miocardio adyacente al septo truncal a lo largo de todo el segmento truncal comienza a estrechar el septo iniciando la separación entre la aorta y el tronco de la arteria pulmonar, hasta separarlas completamente (Figura 2E).

Cada válvula tiene tres valvas e impiden que la sangre retorne a los ventrículos. Inicialmente los anillos valvulares se colocan delante la pulmonar y detrás la aorta con lo que la pulmonar tiene dos valvas posteriores y una anterior, mientras la aorta dos anteriores y una posterior; pero con la rotación del bulbus los anillos se inclinan en sentido antero-posterior y de izquierda a derecha con lo que la pulmonar queda anterior e izquierda y la aorta atrás y derecha. Con esta rotación cambia la posición de las valvas y ahora la pulmonar posee dos valvas anteriores y una posterior y la aorta dos posteriores y una anterior. El tejido miocárdico y mesenquimático se transforma en tejido conectivo

característico de las válvulas ventrículo-arteriales durante la etapa fetal y postnatal. Células de la cresta neural y del mesodermo cardiaco participan en la formación de las válvulas semilunares (Arteaga et al., 1987; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.5. Sistema de conducción del corazón

El latido cardiaco depende de un sistema de marcapasos y un sistema de conducción que transmite el estímulo contráctil a todo el corazón. En la etapa de tubo cardiaco se encuentra el marcapaso en la porción caudal del lado izquierdo, pero con la fusión del tubo se desplaza al seno venoso y con la incorporación del seno venoso a la aurícula derecha queda cercano a la desembocadura de la vena cava superior, este marcapaso es llamado nodo sinusal (sinoauricular). El nodo A-V (aurículo-ventricular) y el haz de his se forman de células del seno venoso izquierdo y de células del canal atrioventricular. El nodo A-V se sitúa en la base del tabique interauricular encima del cojín endocárdico y se conecta con el nodo sinusal a través de células cardiacas modificadas. Se continua con el haz de his que atraviesa el cojín endocárdico y que después de pasar al ventrículo se divide en dos ramas que enseguida se distribuyen en las fibras de purkinje del miocardio; se considera que las células del haz derivan también del tejido que formará el esqueleto cardiaco. Las células de purkinje derivan de un linaje distinto de células miocárdicas que expresan Msx-2. El sistema de conducción se desarrolla antes de la entrada de los nervios por lo que la inervación no interviene en el desarrollo del sistema de conducción (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.6. Inervación del corazón

La inervación del sistema autónomo modula la frecuencia cardiaca. Tres tipos de fibras inervan al corazón: las fibras simpáticas (adrenérgicas) aceleran la frecuencia cardiaca y llegan como prolongaciones de los ganglios simpáticos del tronco que derivan de la cresta neural del tronco. La inervación parasimpática disminuye la frecuencia cardiaca; ésta deriva de la porción cardiaca de la cresta neural craneal; las neuronas de los ganglios cardiacos (neuronas parasimpáticas de 2º orden) migran directamente al corazón desde la cresta

neural y hacen sinapsis con la neuronas de 1° orden que llegan al corazón a través del nervio vago. Finalmente la inervación sensitiva está formada por neuronas que derivan del ectodermo de la plácoda nodosa (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.7. Desarrollo vascular arterial

En la 4° y 5° semana de gestación se forman los arcos faríngeos, cada arco tiene su propia arteria, éstas son llamadas arcos aórticos. Los arcos aórticos se originan del saco aórtico (porción más distal del tronco arterioso) con la raíz aórtica ventral y desembocan en las aortas dorsales, que en la región de los arcos aórticos son pares, pero caudalmente se fusionan las aortas para formar una única aorta. Los arcos y sus arterias aparecen gradualmente en dirección craneocaudal por lo que no todos los arcos están presentes al mismo tiempo. En el humano se forman en realidad sólo 5 pares de arcos, ya que el 5° par no se forma o degenera tempranamente. Se numeran como 1°, 2°, 3°, 4° y 6° pares de arcos aórticos. Las arterias de los arcos presentan modificaciones o regresiones durante el desarrollo (Figura 3A) (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El día 22±1 aparece el 1° arco aórtico o arco mandibular comunicando al saco aórtico con las dos aortas dorsales. El día 27±1 ha desaparecido casi en su totalidad, persistiendo una pequeña porción que forma la arteria maxilar. El 2° arco aórtico también aparece y desaparece casi simultáneamente y forma la arteria hioidea y la del músculo del estribo (estapedia). Posteriormente aparecen los pares aórticos 3°, 4° y 6° (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Para el día 29 han desaparecido el 1° y 2° arcos, mientras que los 3°, 4° y 6° están bien desarrollados y las aortas dorsales se han fusionado a nivel abdominal. El 3° arco forma parte de la arteria carótida común y la primera porción de la carótida interna; el resto de la carótida interna está formada por la porción craneal de la aorta dorsal. La raíz ventral entre el 3° y 4° arco origina la base de la carótida común. La arteria carótida externa deriva de la raíz aórtica ventral craneal al 3° arco aórtico. El tronco arterioso se ha dividido y los 6° arcos aórticos quedan ahora en el tronco de la arteria pulmonar. Con el desarrollo de los siguientes arcos la simetría arterial se pierde (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El 4° arco aórtico forma del lado izquierdo la porción del cayado aórtico situada entre la carótida primitiva izquierda y la subclavia izquierda (7° arteria intersegmentaria izquierda). Del lado derecho forma el segmento más proximal de la subclavia derecha; el resto de esta arteria subclavia es formada por una porción de la aorta dorsal derecha y por la 7° arteria intersegmentaria. La raíz ventral entre el 4° y 6° arco forma del lado derecho la arteria braquiocefálica y del lado izquierdo la porción ascendente de la aorta. El 5° arco no se forma o degenera tempranamente sin formar ninguna estructura (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

El 6° arco aórtico, es llamado el arco pulmonar. Del lado derecho la porción proximal se convierte en el segmento proximal de la arteria pulmonar derecha; la porción distal del arco pierde conexión con la aorta dorsal y degenera. Del lado izquierdo la porción proximal forma la arteria pulmonar izquierda, la porción distal del arco persiste como el conducto arterioso. Del 6° arco surge un plexo capilar asociado a la traquea y yemas pulmonares, irrigado también por las arterias intersegmentarias (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En las aortas dorsales también hay cambios, la aorta craneal al tercer arco forma la arteria carótida interna; entre la desembocadura del 3° y 4° arco se oblitera. El segmento entre el 4° y 6° arco del lado derecho forma parte de la arteria subclavia y del lado izquierdo forma parte de la aorta descendente. La aorta dorsal derecha caudal al 6° arco desaparece entre el origen de la 7° intersegmentaria y la unión con la aorta dorsal izquierda; del lado izquierdo forma una porción de la aorta descendente. Con el desarrollo de la cabeza y el alargamiento del cuello el corazón desciende al tórax y la arteria carótida y braquiocefálica se alargan importantemente. La subclavia izquierda se fija al esbozo del brazo y con el alargamiento del embrión desplaza su punto de origen a nivel de la 7° intersegmentaria hasta colocarse cerca de la carótida primitiva izquierda (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las arterias coronarias se originan de células epiteliales derivadas de células del epicardio que penetran el corazón y se diferencian in situ en arterias coronarias y posteriormente migran hacia la aorta e invaden su pared (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.8. Desarrollo vascular venoso

En la 5° semana se identifican tres pares de venas: las venas onfalomesentéricas o vitelinas (llevan sangre del saco vitelino al seno venoso), las venas umbilicales (se originan de las vellosidades coriales y llevan sangre oxigenada al embrión) y las venas cardinales (reciben la sangre desaturada del cuerpo del embrión) (Figura 3B). Las venas vitelinas drenan sangre del saco vitelino y tienen estrecha relación en la formación de la circulación hepática. Forma un plexo antes de pasar por el septum transversum derivando el mayor volumen de sangre hacia el lado derecho, con lo que se va agrandando la vena vitelina derecha (conducto hepático derecho); este conducto forma la porción hepatocardiaca de la vena cava inferior, desapareciendo la vena vitelina izquierda (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las venas umbilicales pasan a cada lado del hígado y se anastomosan a los sinusoides hepáticos. Posteriormente desaparecen las porciones proximales de ambas venas umbilicales. La vena umbilical derecha desaparece completamente y sólo la vena izquierda transporta sangre desde la placenta hasta el hígado. La vena umbilical se conecta con el conducto hepatocardiaco a través del conducto venoso. Después del nacimiento se oblitera la vena umbilical izquierda y el conducto venoso formando el ligamento redondo del hígado y el ligamento venoso respectivamente (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las venas cardinales forman el sistema venoso del embrión. Las venas cardinales están formadas por diferentes grupos venosos que aparecen progresivamente. Inician con la formación de las cardinales anteriores (reciben la sangre de la porción cefálica del embrión) y las cardinales posteriores (reciben la sangre del resto del cuerpo), que se unen formando las venas cardinales comunes que entran al seno venoso (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En la 5° semana se forman las venas subcardinales (drenan la sangre de los riñones), las venas sacrocardinales (drenan las extremidades inferiores) y las venas supracardinales (drenan la pared del cuerpo por medio de las venas intercostales y asume la función de las venas cardinales posteriores). La vena braquiocefálica izquierda se forma por la anastomosis de las venas cardinales anteriores, por lo que gran parte del flujo de la cabeza y brazo del lado izquierdo se desvían al lado derecho al conectar la yugular interna izquierda

con la derecha, que se forman de la parte craneal de las cardinales anteriores. La vena cardinal común derecha y la porción proximal de la vena cardinal anterior derecha forman la vena cava superior. La porción proximal de la vena cardinal común izquierda persiste como el seno coronario. La porción de la vena cardinal posterior izquierda que penetra a la vena braquiocefálica izquierda persiste como la vena intercostal superior izquierda y recibe sangre de los espacios intercostales 2° y 3° (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las subcardinales están conectadas con las cardinales posteriores. De la anastomosis de las venas subcardinales se forma la vena renal izquierda, posteriormente desaparece la subcardinal izquierda y solo persiste la porción distal como la vena gonadal izquierda. La vena subcardinal derecha forma el conducto principal y forma el segmento renal de la vena cava inferior. La anastomosis de las sacrocardinales forma la vena iliaca primitiva izquierda. La sacrocardinal derecha forma el segmento sacrocardinal de la vena cava inferior. Cuando el segmento renal se conecta con el segmento hepático que deriva de la vena vitelina derecha completa su formación (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las venas supracardinales drenan la pared corporal al obliterarse las venas cardinales posteriores; las venas intercostales 4° a 11° drenan en la vena supracardinal derecha que junto con una porción de la cardinal posterior forman la vena ácigos. Del lado izquierdo, las venas intercostales 4° a 7° desembocan en la supracardinal izquierda, que forma la vena hemiacigos la cual finalmente drena en la vena ácigos (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.1.9. Circulación cardiaca y cambios circulatorios al nacimiento

La contracción del corazón embrionario comienza con la fusión de los tubos endocárdicos, la circulación sanguínea inicia poco tiempo después; en el humano sucede entre el día 21 y 23 de gestación. Los segmentos no fusionados no laten por lo que el ritmo inicial está dado por los ventrículos con una frecuencia de 25 latidos por minuto, después es tomado por las aurículas que laten a 60 latidos por minuto y finalmente por el seno venoso que late a 140 por minuto, marcando el ritmo de contracción al resto de los tejidos. La sangre se desplaza a través del tubo cardiaco por contracciones de los segmentos con movimientos similares a

la peristalsis. Los cojines endocárdicos funcionan como válvulas cardiacas primitivas y evitan el retorno de la sangre al corazón (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

La sangre saturada de oxígeno aproximadamente en un 80% proviene de la placenta y pasa al feto por la vena umbilical con gran presión. En el hígado la sangre de la vena umbilical pasa directamente al conducto venoso evitando los capilares hepáticos gracias a la elevada presión que posee y se continúa enseguida con la vena cava inferior y de ahí al corazón. Existe un esfínter en el conducto venoso cerca de la desembocadura de la vena umbilical, cerrándose cuando el flujo umbilical es excesivo. La sangre que entra al sistema hepático termina mezclándose con la sangre de la vena umbilical a través de las venas hepáticas y la vena porta. En la vena cava inferior se produce otra mezcla de sangre umbilical y sistémica proveniente del cuerpo del feto (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Por la posición de la vena cava inferior el flujo de sangre ligeramente con mayor presión es guiado hacia el foramen oval y pasa la sangre hacia el atrio izquierdo. El atrio izquierdo recibe sangre bien oxigenada del atrio derecho que mezcla con un poco de sangre no saturada proveniente de las venas pulmonares. Enseguida, la sangre pasa al ventrículo izquierdo, a la aorta y de ahí es enviada hacia el miocardio y cerebro a través de las coronarias y carótidas como principales órganos en desarrollo. A la altura de la aorta descendente desemboca el conducto arterioso que lleva sangre poco oxigenada a la aorta, que finalmente distribuye al resto del cuerpo. En el extremo caudal de la aorta se forman las dos arterias umbilicales que se dirigen a la placenta enviando parte del volumen sanguíneo desoxigenado (saturación del 58%) para que se oxigene (Figura 3C) (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Cuando baja la presión sanguínea de la vena cava inferior, se permite el paso de sangre desoxigenada de la vena cava superior; este volumen de sangre pasa al ventrículo derecho, la arteria pulmonar y hacia los pulmones; dado que los pulmones no son capaces de recibir todo el flujo sanguíneo la sangre que no cabe se deriva hacia la aorta a través del conducto (ductus) arterioso, protegiendo a los pulmones de la sobrecarga sanguínea y permitiendo el correcto desarrollo del ventrículo derecho (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Los cambios al nacimiento dependen de la supresión del flujo sanguíneo placentario e inicio de la función pulmonar. La interrupción del flujo placentario origina una disminución

en la presión del lado derecho y aumento en el lado izquierdo provocando el cierre del foramen oval, y del conducto arterioso, que responde también a un aumento importante en la saturación de oxígeno. La expansión pulmonar permite mayor flujo de sangre disminuyendo también la presión del lado derecho del corazón. Se obliteran las arterias umbilicales formando los ligamentos umbilicales medios y las arterias vesicales superiores. La vena umbilical y el conducto venoso se obliteran y forman el ligamento redondo del hígado y el ligamento venoso respectivamente. El conducto arterioso se cierra en respuesta a la concentración de oxígeno y a la bradicinina producida por la insuflación pulmonar que producen contracción del músculo de la pared del vaso. El cierre anatómico del conducto sucede 1 mes después formando el ligamento arterioso. El cierre del agujero oval se produce con la respiración que provoca una inversión en las presiones del corazón, la presión constante del lado izquierdo produce una fusión entre el septum primum y el septum secundum interauricular en el primer año de vida (Figura 3D) (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

4.2. ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del complejo B, antes conocida como B₉. Es considerada como un nutriente esencial, ya que el humano es incapaz de sintetizarla, la obtiene de los alimentos o a partir de algunas bacterias intestinales. Actúa como coenzima para la síntesis de ADN, ARN y diversas proteínas. El ácido fólico contribuye en el crecimiento tisular, funcionamiento celular, incrementa el apetito y estimula la formación de ácidos digestivos. La avitaminosis de ácido fólico es una de las más frecuentes y recientemente ha adquirido gran importancia por su asociación con enfermedades cardiovasculares y malformaciones congénitas.

4.2.1. Estructura química del ácido fólico

El ácido fólico es la vitamina, pero sus productos reducidos son las formas reales de la coenzima. Resulta de la unión de un anillo de pteridina (ácido pterico), ácido p-

aminobenzoico y glutamato (una o varias moléculas de ácido L-glutámico) unidos por uniones peptídicas (Fernández, 1992).

El anillo de pteridina puede encontrarse en forma no reducida, parcialmente reducida (FH2) y reducida (FH4). El anillo de pteridina es incapaz de sintetizarse en el organismo por lo que es el que se obtiene de la dieta (Fernández, 1992). La forma más sencilla del ácido fólico es el ácido monopteroilglutámico, pero se encuentra normalmente en forma de sus derivados poliglutamato con un total de 2 a 7 restos de ácido glutámico (Devlin, 1991; Fernández, 1992).

4.2.2 Fuentes dietéticas y requerimientos

El ácido fólico puede presentarse de dos maneras: monoglutámico (terapéutico) o poliglutámico (en los alimentos); en los alimentos se encuentra en gran medida en forma de folilpoliglutamatos. El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico y sus derivados péptidos di, tri y heptaglutamil) están extensamente distribuidos en la naturaleza, por lo que es difícil producir cuadros carenciales, además de que en el organismo se necesitan bajas dosis de ácido fólico. Las bacterias intestinales producen esas pequeñas cantidades necesarias para el crecimiento. Sin embargo es importante mencionar que los folatos son muy sensibles al calor; la cocción durante 5 a 10 minutos de los alimentos destruye hasta el 95% de los folatos (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al., 1996; Achon et al., 1999).

Se encuentra en carnes, principalmente hígado y riñón, legumbres, cereales, cítricos, té, frutas y vegetales frescos de hojas verdes y amarillas; es escaso en la leche de vaca, pero la leche materna posee cantidades suficientes para el lactante. Los requerimientos en los seres humanos es de 50 a 200 µg, manteniendo reservas tisulares entre 5-10mg (5 000-10 000 µg), que se almacenan en forma de derivado poliglutamato de tetrahidrofolato, siendo el hígado el principal órgano de reserva, por lo tanto las reservas tisulares son limitadas y un individuo sano con interrupción de ingesta o aumento en las necesidades presentará un deficiencia en un término de 5 meses. La concentración normal de ácido fólico en sangre es de 7-16 ng/mL (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al., 1996; Achon et al., 1999).

Hombre adulto: 200 mg/día.

Mujer adulta: 180 mg/día.

Mujer embarazada: 280-400mg/día.

Mujer en lactancia: 280 mg/día.

Lactante menor: 3.6 mg/kg/día.

4.2.3. Absorción y distribución

Las células de la mucosa intestinal captan los compuestos y durante la absorción las conjugadas intestinales eliminan los restos de glutamato de los poliglutamatos y los escinden a monoglutamatos, debido a que la cadena lateral de los poliglutamatos es muy polar e impide su absorción. Los monoglutamatos se absorben en el duodeno y yeyuno proximal por transporte activo, el metilen-tetrahidrofolato se absorbe por difusión simple. Durante la absorción intestinal son modificados y entran a la circulación sanguínea únicamente como N⁵-metiltetrahidrofolato. En la célula intestinal el monoglutamato es reducido en colaboración de la dihidrofolato reductasa y transformado en tetrahidrofolato, que posteriormente se transforma en N⁵-metiltetrahidrofolato en el intestino y en el hígado, pasa a la circulación unido a la albúmina para transportarse en el plasma y una porción es poliglutamada por el hepatocito para almacenamiento. Gran parte del monoglutamato es excretado con la bilis al intestino donde puede ser reabsorbido (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Méndez e Inocencio, 2005).

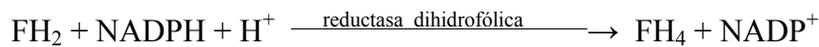
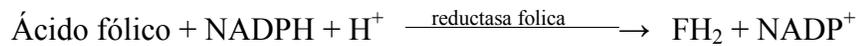
En el interior de las células los tetrahidrofolatos son convertidos en forma de derivados poliglutamato en sus formas biológicas más potentes asegurando su permanencia en el interior de la célula. La redistribución de las reservas hepáticas depende de la circulación enterohepática, debido a que el folato hepático es rápidamente movilizado. La absorción está facilitada por el ácido ascórbico e inhibida por el alcohol, los anticonceptivos orales y difenilhidantoina (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Méndez e Inocencio, 2005).

4.2.4. Funciones metabólicas

La función primordial del ácido fólico, específicamente de los derivados del tetrahidrofolato es actuar como intermediario en la transferencia de grupos de un sólo átomo

de carbono, como los grupos formilo y metilo a diversos compuestos (Cotran et al., 1996). La forma activa es el tetrahidrofolato (Fernández, 1992). Diversas reacciones biosintéticas utilizan derivados monocarbonados del tetrahidrofolato, por ejemplo la síntesis de nucleótidos, colina, serina, glicina metionina, purinas y dTMP; por ello las reacciones de donación de un carbono son requeridas en la síntesis de fosfolípidos, ADN, proteínas y neurotransmisores, además de intervenir en reacciones de metilación (Devlin, 1991).

La reductasa fólica reduce el ácido fólico a ácido dihidrofólico y éste a su vez se reduce por la reductasa dihidrofólica (DHFR, enzima citosólica) a ácido tetrahidrofolico; el agente reductor en ambas es el NADPH (Conn y Stumpf, 1978; Stryer, 1990).



El tetrahidrofolato o tetrahydropteroylpoliglutamato (h4PteGlu³/FH₄) transporta el fragmento monocarbonado unido al nitrógeno N-5 y/o al N-10 (N⁵ y N¹⁰). Este fragmento puede estar en tres niveles de oxidación. La forma más reducida transporta un metilo, la forma intermedia un metileno y las más oxidadas son metenilo, formilo o formimino. Estas unidades son interconvertibles, es decir, el N⁵-N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato puede reducirse a N⁵-metiltetrahidrofolato o bien oxidarse a N⁵-N¹⁰-meteniltetrahidrofolato, y éste a su vez puede convertirse en N⁵-formimino-tetrahidrofolato o N¹⁰-formil-tetrahidrofolato que son compuestos del mismo nivel de oxidación. El N¹⁰-formil-tetrahidrofolato también puede sintetizarse a partir de tetrafolato, formiato y ATP y el N⁵-formimino-tetrahidrofolato también se forma de la ruptura de la histidina (Stryer, 1990).

El tetrahidrofolato (FH₄) actúa como donador y aceptor de los compuestos monocarbonados, es decir, interviene como aceptor de fragmentos de un átomo de carbono de compuestos como serina, mientras que el ácido formimino-glutámico y los derivados de ácido tetrahidrofolico generados donan los fragmentos de un átomo de carbono para la síntesis de moléculas biológicamente activas. Los folatos derivados son una reserva de donadores para compuestos intermediarios en la síntesis de macromoléculas (Conn y Stumpf, 1978). Por ejemplo el N⁵-metil-tetrahidrofolato aporta el grupo metilo a la homocisteína para formar metionina, átomos de carbono de las purinas derivan del N¹⁰-formil-tetrahidrofolato, la timina recibe un grupo metilo del N⁵-N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato

y este compuesto también cede un fragmento monocarbonado en la formación de glicina en presencia de CO_2 y NH_4^+ .

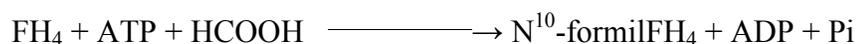
Los procesos metabólicos más importantes que dependen de la transferencia de un carbono son (Figura 4):

- 1.- La síntesis de purinas, formando ribonucleótidos.
- 2.- Síntesis de nucleótidos de pirimidinas, formando monofosfato de desoxitimidilato por la transformación de desoxiuridilato.
- 3.- Síntesis de metionina a partir de homociteina, junto con Vitamina B_{12} .
- 4.- Conversión de serina a glicina junto con piridoxina, de histidina a glutámico.

Los cofactores del folato actúan como donadores en ciclos metabólicos interconectados, donde varias enzimas son responsables en la donación de la unidad de carbono, pero específicamente dos derivados del ácido tetrahidrofólico tienen funciones importantes en la síntesis de novo de purinas y timidilato:

- El N^{10} -formil-tetrahydrofolato participa en la síntesis de purinas en reacciones catalizadas por la glicinamida-ribonucleotido-formiltransferasa y la 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido-formiltransferasa;
- El $\text{N}^5\text{-N}^{10}$ -metilen-tetrahydrofolato es la coenzima para la reacción de metilación reductiva convirtiendo el dUMP a dTMP por la timidilato sintetasa, de esta reacción se obtiene dihydrofolato y debe reducirse para regresar a tetrahydrofolato por la DHFR para regenerar la actividad de la fuente de folatos (Cotran, 1996; Faessel, 1998).

La importancia del ácido tetrahidrofólico en la biosíntesis de purinas, serina y glicina es transportar una unidad C_1 al nivel de oxidación del formaldehído (unidad formiato). La química de la unidad formiato incluye la activación del ácido fórmico (Conn y Stumpf, 1978).



El N^{10} -formil FH_4 reacciona y cierra su anillo para formar $\text{N}^5\text{-N}^{10}$ -metenil FH_4 el que a continuación se reduce por NADPH en presencia de una deshidrogenasa a $\text{N}^5\text{-N}^{10}$ -

metilFH₄. Durante la síntesis de la glicina, la serina aporta un átomo de carbono β de su cadena lateral al tetrahidrofolato, formando glicina y N⁵-N¹⁰-metilFH₄. La glicina también puede formarse a partir de CO₂, NH₄⁺ y metilFH₄ por la glicina sintetasa (Stryer, 1990). El N⁵-N¹⁰-metilFH₄ (obtenido por reducción del formiato) forma serina en presencia de fosfato de piridoxal, glicina y serina-hidroxil metilasa (Conn y Stumpf, 1978).

La segunda intervención importante del tetrahidrofolato es la síntesis de timina. Debido a que el uracilo no forma parte del ADN, se convierte en timina para poder integrarse a la molécula. Este paso sucede a nivel del desoxiuridilato que se metila a desoxitimidilato por la timidilato sintetasa, donde el dador de metilos es el N⁵-N¹⁰-metilFH₄, el metilo que dona es más reducido que su metileno porque el tetrahidrofolato dona además dos electrones en forma de ión hidruro (H:H-) que se separa del anillo del tetrahidrofolato; este hidruro se integra al grupo metilo del dTMP. Así el N⁵N¹⁰-metilFH₄ participa como dador de electrones de hidrógeno y de un fragmento monocarbonado para la síntesis del grupo CH₃ donado. De esta reacción se produce dihidrofolato que debe ser reducido a tetrahidrofolato por la dihidrofolato reductasa para volver al depósito. Las dos primeras reacciones del ácido dihidrofólico permiten que se regenere por la DHFR a partir de su derivados portadores de un carbono y reingresa en el sector donante (Conn y Stumpf, 1978).

La formación de tetrahidrofolato a partir de N⁵-metilFH₄ es importante en el mantenimiento de los depósitos de tetrahidrofolato para formar nuevos derivados como el N⁵-N¹⁰-metilTHF₄ catalizado por la timidilatosintetasa que se requiere como se ha mencionado para la conversión de monofosfato de desoxiuridina en monofosfato de desoxitimidina, precursor del ADN. Se ha propuesto que la causa principal de la alteración de la síntesis de ADN es la disminución de ácido tetrahrofólico disponible, al quedar en atrapado gran parte en forma de N⁵-metiltetrahidrofolato no conjugado. La deficiencia de metilcobalamina (Vitamina B₁₂) impide su transformación a otras formas de folato. El proceso que causa la acumulación del N⁵ metiltetrahidrofolato se conoce como “trampa de los folatos o atrapamiento de folatos” y su consecuencia es el bloqueo de las funciones metabólicas del ácido fólico y pérdida de los depósitos de folatos debido a que el N⁵-metilFH₄ no conjugado es sacado de la célula. La síntesis de poliglutamatos precisa grupos formiato de un átomo de carbón derivados de la metionina, la cual es generada por una

reacción dependiente de Vitamina B₁₂ (Devlin 1991; Fernández, 1992; Clark et al., 1992; Cotran et al., 1996; Méndez e Inocencio, 2005).

La metilcobalamina es un cofactor esencial de la enzima N⁵-metilFH₄homocisteína metiltransferasa involucrada en la conversión de homocisteína en metionina, donde la metilcobalamina aporta su grupo metilo y se restablece a partir del ácido N⁵-metiltetrahidrofólico que se convierte en ácido tetrahidrofólico. La vitamina B₁₂ también es necesaria para la captación de folatos por las células (Devlin 1991; Fernández, 1992; Clark et al., 1992; Cotran et al., 1996; Méndez e Inocencio 2005).

La colina es un compuesto rico en metil necesario en la síntesis de fosfolípidos y función neurotransmisora. Los dos compuestos están estrechamente relacionados con el ciclo metil. El N⁵-metiltetrahidrofolato puede proveer grupos metilo a la homocisteína para sintetizar metionina, la metionina es convertida a S-adenilmetionina, que es el donador de grupos metilo en la síntesis de fosfolípidos, como la fosfatidilcolina (Devlin, 1991; Jacob, 1999).

Otra reacción dependiente del ácido fólico es la conversión del ácido formiminoglutámico a ácido glutámico en la vía metabólica de la histidina, en donde el ácido tetrahidrofólico recibe el grupo formimino, originando el N⁵-formiminoFH₄ y ácido glutámico. (Clark et al., 1992; Cotran et al., 1996; Mendez e Inocencio, 2005).

4.2.5. Ácido Fólico y Embarazo

La situación más común de incremento en las necesidades de folatos es el embarazo y la lactancia, por el aumento en el número de células en división rápida en el cuerpo de la madre. En el embarazo el requerimiento aumenta a 400 µg, incluso por arriba de 400mg/día en casos de embarazo múltiple, infección o embarazo de riesgo; además hay un descenso en la absorción y aumento en la eliminación del folato durante el embarazo y en el tercer trimestre las exigencias se duplican. El ácido fólico es transportado en forma activa de la placenta al feto. Los requerimientos de una mujer no embarazada son entre 0.05 a 0.1 mg/día, pero en la embarazada son de 0.15 mg/día por el incremento de la eritropoyesis materna y el crecimiento fetal. Las concentraciones séricas de folatos disminuyen a lo largo del embarazo pudiendo llegar hasta un 50% menos que las concentraciones previas al

embarazo. Por lo que el 15% de las mujeres embarazadas pueden presentar deficiencia de ácido fólico o anemia por déficit de folatos (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al., 1996; Achon et al., 1999).

Durante el embarazo se debe diferenciar la anemia megaloblástica por deficiencia de folatos de la anemia dilucional fisiológica del embarazo causada por aumento del volumen plasmático en un 40%, lo que disminuye el hematocrito, pero no altera el aporte de oxígeno al feto, ni modifica la morfología de la médula ósea.

La administración de complementos de hierro, ácido fólico y vitaminas en la mujer embarazada puede reducir la deficiencia de folatos, la anemia y el riesgo de defectos al nacimiento, por ejemplo defectos del tubo neural (DTN). Sin embargo, por las diferencias de biodisponibilidad entre los folatos provenientes de los alimentos y los sintéticos (usados para la suplementación) se recomienda aumentar la dosis de éstos a 600µg y en los casos de mujeres gestantes con antecedente de DTN se puede incrementar la dosis hasta 4mg (20 veces la dosis diaria recomendada). Entre los efectos no deseados por dosis altas de ácido fólico es que enmascara la deficiencia de cobalamina en la anemia perniciosa (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al., 1996; Achon et al., 1999).

Es por eso que se recomienda el uso profiláctico desde un mes antes a la concepción, durante el embarazo, lactancia e infancia, principalmente en mujeres con antecedente de malformaciones. La carencia de ácido fólico puede afectar el crecimiento fetal y postnatal en el primer año de vida. En la infancia con el rápido crecimiento corporal, aumenta la síntesis de ADN y proteínas, por tanto aumenta la demanda de ácido fólico.

4.2.6. Deficiencias de ácido fólico, cuadro clínico y consecuencias de la deficiencia de ácido fólico

Las principales causas de deficiencia son la ingesta deficiente, alteraciones en la absorción intestinal o la interferencia de ésta por fármacos y aumento en los requerimientos. Las etiologías de deficiencia de ácido fólico son: ingestión reducida, alcoholismo, malabsorción, por consumo elevado de folatos por anemia hemolítica, embarazo, lactancia, prematurez, crecimiento, recambio celular aumentado, enfermedades malignas, hipertiroidismo, porfirias agudas, hemoglobinuria paroxística nocturna, mielofibrosis con

metaplasia mieloide, leucemias agudas, hemodiálisis, sprue tropical y no tropical, enfermedades intestinales, medicamentos como etanol, trimetoprim, trimetrexato-pirimetamina, metotrexate, sulfamidas (sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfadiacina, sulfasalazina), anticonceptivos orales, estrógenos y antiepilépticos que alteran el metabolismo de los folatos. La anemia hemolítica incrementa los requerimientos de folatos de 3 a 6 veces más. Son más frecuentes las deficiencias de AF en los pobres de todos los países con dietas límite, mujeres gestantes con dietas inadecuadas, alcohólicos y drogadictos (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al, 1996).

Algunos estudios han demostrado que la deficiencia de folato origina pérdida de la capacidad de proliferación celular, acompañada de detención del crecimiento, observándose grandes índices de muerte celular, por la inhibición en la síntesis de ADN debida a una disminución en la disponibilidad de purinas y dTMP. Hay un cambio megaloblástico típico en el tamaño y forma de los núcleos de las células en división rápida con aumento en la muerte celular. La alteración de cadenas de dNTP se han sugerido como signos bioquímicos de fragmentación de DNA y muerte celular apoptótica celular, puede considerarse como causa de la falla de replicación del DNA y o reparación de mutagénesis y la deficiencia de folato induce desbalance de dNTP. Al iniciar la deficiencia las células muestran alto índice de células en fase S seguido de una disminución brusca y acompañada de una disminución de G₀/G₁ y subsecuentemente de G₂/M (Devlin, 1991; Huang, 1999).

Los derivados de folato son importantes en la formación de los eritrocitos normales, por lo que un bloqueo en la síntesis de ADN retrasa la maduración de los eritrocitos dando lugar a eritrocitos macrocíticos con membranas frágiles. La anemia macrocítica asociada a cambios megaloblásticos en la médula ósea (anemia megaloblástica) es característica de la deficiencia de folatos, presenta una morfología anómala de las células hematopoyéticas y otras células con una división rápida, a causa del trastorno de síntesis de ADN. Los síntomas de deficiencia son esprue, anemia megaloblástica, defectos en el tubo neural en niños de madres con deficiencias de folatos (Devlin, 1991; Fernández, 1992; Cotran et al., 1996).

Los mejores indicadores de los niveles de folatos tisulares son los derivados poliglutamato de folato en los eritrocitos. Estos derivados descienden más lentamente ante la carencia de

folatos y los síntomas de deficiencia se manifiestan solamente cuando se agotan los folatos tisulares. El déficit de ácido fólico presenta aumento sólo de la homocisteína y la deficiencia de la vitamina B₁₂ aumenta el ácido metilmalónico y la homocisteína. La homocisteína extracelular es un marcador del folato intracelular (Devlin 1991; Clark et al., 1992; Fernández, 1992; Cotran et al, 1996). Aunado a un bajo nivel de folatos se presentan niveles elevados de homocisteína y aminoácido recientemente asociado como factor de riesgo para lesión cardiovascular (Achon et al., 1999). La elevación de la homocisteína plasmática es un factor de riesgo para aterosclerosis, pero puede ser reducida con suplementación vitamínica con ácido fólico, B6 y B12, la vitamina B6 sola no tiene efecto, debe acompañarse la suplementación con AF.

En la depleción de folato y la inhibición de un de ión de la remetilación de homocisteína inducida por metotrexate llevó a una reducción de N⁵-metiltetrahidrofolato, sugiriendo que la depleción de ésta puede ser explicada por inhibición de la reductasa metileno tetrahidrofolato; diversos estudios orientan a que el metotrexate guía el aumento del nivel de homocisteína extracelular (Fiskerstrand, 1997).

La dihidrofolato reductasa puede ser inhibida por diversos fármacos haciendo este paso muy importante en diversos aspectos. El monofosfato de desoxitimidilato es necesario para la síntesis de ADN, siendo esencial en la síntesis y recambio rápido de ADN en tejidos como el hematopoyético, gastrointestinal y el embrionario; una deficiencia en la síntesis de timidilato suprime la síntesis de ADN. En ausencia de ácido fólico y/o B₁₂ la enzima timidilato sintetasa transforma el monofosfato de desoxiuridilato en trifosfato de desoxiurilato a un mayor ritmo originando que se almacene y se incorpore en el lugar de el trifosfato de desoxitimidilato, lo que obliga a la escisión, reparación y resíntesis de ADN, llevando a un retardo en la síntesis de ADN e irregularidades de éste que se expresan con células malformadas con núcleos inmaduros en relación al citoplasma (Clark et al., 1992; Cotran et al., 1996; Mendez e Inocencio, 2005).

El metotrexate, 6-mercaptopurina y la ciclofosfamida inhiben la dihidrofolato reductasa causando un déficit de tetrahidrofolato (Cotran et al., 1996; Fiskerstrand, 1997).

4.3. METOTREXATE

El metotrexate (MTX) es un antagonista del ácido fólico, citotóxico, análogo químico del dihidrofolato, que actúa especialmente durante la fase S de la división celular entorpeciendo la síntesis del ADN por una potente inhibición competitiva de la dihidrofolato reductasa.

4.3.1. Farmacocinética

La absorción oral del MTX es muy variable, depende de la dosis, que interviene en la variabilidad en el tiempo de concentración máxima. Características propias de la vía oral modifican la absorción, por ejemplo, los alimentos retrasan la absorción y disminuyen los valores plasmáticos máximos y la flora intestinal metaboliza una tercera parte de la dosis limitando la absorción. La absorción de MTX es rápida a dosis menores de 30 mg/m^2 , pero la absorción es mejor al bajar al 50% esta dosis ($10\text{-}15 \text{ mg/m}^2$) (Jolivet, 1983b). Se absorbe completamente por vía parenteral. La aplicación intramuscular proporciona una concentración plasmática máxima en 30 a 60 minutos (Katzung, 1994; PLM, 1999). La administración subcutánea de MTX se acumula más rápidamente en células tumorales, seguidos del intestino delgado y por lo tanto se exponen a mayor duración en la inhibición de la síntesis de ADN. En la médula ósea la rápida recuperación de la síntesis de DNA es debida a una pérdida más rápida del MTX lo que explica su menor sensibilidad (Sirotnak, 1980).

El MTX como un ácido orgánico débil, está cargado negativamente a pH neutro, limitando su liposolubilidad y difundiendo lentamente las membranas biológicas, esto limita la capacidad de entrar hacia el líquido cefalorraquídeo y a los fluidos del tercer espacio (Jolivet, 1983b). Las formulaciones y diluyentes con conservadores no se administraran por vía intratecal o a dosis altas (PLM, 1999). El MTX tiene una biodisponibilidad de 24-70%, pero disminuye con el incremento de la dosis oral. La vida media terminal del metotrexate es de 3 a 10 horas, se incrementa de 8 a 5 horas con dosis altas. El aclaramiento es de un $1.5\text{-}2.1 \text{ ml/min/kg}$. En el plasma está unido a proteínas aproximadamente en un 50% (Clark, 1992). Estudios muestran que puede ser desplazado el metotrexate de la albúmina por varios compuestos por ejemplo sulfonamidas, salicilatos, tetraciclinas, cloramfenicol y

fenitoína. La retención y acción varía en los diferentes tejidos, células y tumores, de la dosis, del número de aplicaciones y la edad de los pacientes (PLM, 1999; Katzung, 1994).

Posterior a la ingesta de MTX se observa una fase inicial rápida con una concentración extracelular de MTX de 1 a 100 μM y niveles intracelulares fijos en 60 minutos.

La vía principal de eliminación es la excreción renal un 80-90%, que depende de la dosis y vía de administración. Por vía IV 80-90% de la dosis se excreta sin cambios a las 24 horas; por vía oral se elimina el 90% en 12 horas. La excreción biliar es limitada a menos del 10% (Fernández, 1992; Cotran, 1996). La excreción renal proviene de la filtración glomerular y secreción tubular renal activa; sin embargo este proceso se saturan con dosis altas de MTX. Pueden incrementarse las concentraciones plasmáticas usando ácidos orgánicos que se excretan por secreción tubular, estos ácidos incluyendo los AINE's inhiben competitivamente la secreción tubular renal del MTX, disminuyendo la depuración del fármaco, resultando en un incremento de las concentraciones séricas y de sus complicaciones. La alcalinización de la diuresis es esencial para prevenir la nefrotoxicidad probablemente debida a la precipitación del MTX o su 7-OHMTX en los túbulos renales. Así mismo con el deterioro de la función renal o fugas al tercer espacio se eleva el riesgo de presentar toxicidad grave (Jolivet 1983a; Jolivet 1983b; Katzung, 1994; PLM, 1999).

La mayoría de los tratamientos induce mielotoxicidad o nefrotoxicidad con disminución de la filtración glomerular. Entre las causas de la toxicidad está la depuración lenta del metotrexate. Se ha propuesto que la citotoxicidad es directamente proporcional al tiempo de exposición más que de los valores plasmáticos máximos. El potencial de toxicidad disminuye con la administración de ácido fólico terapéutico (Leucovorin) (Jolivet 1983a; Katzung, 1994, PLM, 1999).

La reactividad cruzada entre el MTX y el 7-hidroxiMTX es importante porque se elimina más lentamente por el riñón porque su precipitado es altamente insoluble en soluciones acuosas, por lo que este compuesto contribuye importantemente en la toxicidad renal a altas dosis de MTX y es un factor en la falla renal fatal. A dosis altas la eliminación es 84% renal por filtración glomerular y en menor grado por secreción tubular. Adicionalmente a la eliminación renal presenta eliminación biliar.

4.3.2. Farmacodinamia

Se han observado diferentes rutas en la entrada de MTX. A dosis bajas (concentraciones extracelulares de $20\mu\text{M}$ o menos) depende de temperatura y energía, la ruta es saturable e inhibida por estructuras análogas. A dosis altas es saturable, no dependiente de temperatura o energía y la vía no es alterada por análogos del ácido fólico (Warren, 1978; Schilsky, 1981, Goldman, 1969). En concentraciones plasmáticas mayores a $100\mu\text{M}$ la vía principal es por difusión pasiva (PLM, 1999; Katzung, 1994).

El mecanismo de entrada (a concentraciones altas de MTX) que involucra la difusión, es menos efectivo pero explica la mayor fracción de fármaco que entra a las células a altas concentraciones (Jolivet, 1983a; Jolivet, 1983b).

El MTX utiliza el sistema de transporte activo usado para la circulación fisiológica de 5-metilTHF y 5-formilTHF. El MTX compite con folatos reducidos por el transporte activo a través de las membranas, el proceso es mediado por un transportador. El receptor RFC1 no es selectivo y transporta 5-metil-THF principalmente, 5-formil-THF y antifolatos como MTX (Zhao, 1999). A pH fisiológico el transporte presenta cinética competitiva reversible (Katzung, 1994). Los ácidos incrementan el flujo unidireccional de MTX, con un aumento en la velocidad del transporte. Los ácidos incrementan la diferencia de potencial electroquímico intra/extracelular del MTX por lo que el transporte dependiente de energía aumenta en presencia de ácidos (Goldman, 1969). La dihidrofolatoreductasa puede dirigirse a la mitocondria si se une a una secuencia mitocondrial, pero la captación de DHFR por la mitocondria es inhibida por el metotrexate (Stryer, 1990).

Después de entrar a la célula, el MTX se une rápidamente en el sitio catalítico activo de la enzima DHFR inhibiéndola y produciendo el bloqueo de la reducción del dihidrofolato (forma inactiva) en tetrahidrofolato (forma activa) obstaculizando la formación de folatos reducidos necesarios en la biosíntesis de purinas, ácido timidílico e isosínico y por lo tanto en la síntesis de proteínas, RNA y DNA; trastorna el funcionamiento del núcleo celular y la mitosis con lo que afecta el desarrollo, reproducción y vida celular. Su efecto es máximo en tejidos de proliferación rápida y/o descontrolada como los cánceres, tumores de crecimiento rápido, desafortunadamente tejidos normales con proliferación celular rápida como la médula ósea, tejido fetal, folículos pilosos, mucosas gastrointestinal y bucal también son

afectados. Cuando la proliferación de células en tejidos malignos es mayor que en los tejidos normales, el metotrexate impide la proliferación maligna sin daño irreversible de los tejidos normales (PLM, 1999; Katzung, 1994; Stryer, 1990).

El MTX es un agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de leucemias, linfomas, sarcoma osteogénico, coriocarcinoma, adenocarcinomas, cáncer de hígado, psoriasis, enfermedades reumáticas y la supresión de la enfermedad injerto contra huésped en el trasplante de médula ósea (Schilsky, 1980; Schilsky, 1981; Jolivet, 1983b).

El ácido fólico es protector para las células expuestas a antifolatos, porque tiene más competitividad y afinidad que los antifolatos, pero poca capacidad de revertir los efectos a concentraciones bajas (Schilsky, 1981).

Los inhibidores de la DHFR alteran los depósitos de folatos, facilitando la interacción entre el antifolato y sus poliglutamatos con las enzimas dependientes de folatos; esto explica porque una disminución en las concentraciones de los cofactores de folato reduce la competencia para la poliglutaminación, aumentando la cantidad de poliglutamatos de MTX y facilitando la unión a la enzima de los antifolatos (Faessel, 1998).

El MTX es un monoglutamato que presentan poliglutamación intracelular similar a la que ocurre normalmente con los folatos (Allegra, 1985). El MTX es metabolizado a poliglutamatos (más activos que el fármaco original) en los eritrocitos, hepatocitos y otras células. Su síntesis se incrementa con el incremento de las concentraciones de la droga y la duración de exposición. Los hepatocitos forman mono-, di- tri- y poli- γ -glutamil derivados de MTX que contienen de 2 a 4 residuos glutamato (Rhee, 1986).

Las altas concentraciones del fármaco por periodos largos lleva a alargar las cadenas de los poliglutamatos. Los monoglutamatos de MTX son rápidamente reversibles en su efecto inhibitorio de la MTHFR tanto en sus concentraciones intra y extracelulares. Los poliglutamatos se disocian más lentamente de la DHFR que el MTX, son inhibidores más consistentes y menos reversibles.

Dentro de sus propiedades más importantes está que se mantienen mayor tiempo dentro de la célula prolongando el efecto antimetabólico. Mayor retención se asocia con inhibición más prolongada de la DHFR y mayor citotoxicidad. El MTX es un inhibidor altamente específico para DHFR. la adición de grupos glutamil incrementan la inhibición para otras

enzimas de la vía de los folatos (TS, AICARTasa y GARTasa) pero son 100 veces menos potentes que para la DHFR (Schilsky, 1980; Sirotnak, 1980; Jolivet, 1983a; Jolivet, 1983b; Fabre, 1984; Allegra, 1985; Chabner, 1985).

Debido a que la permeabilidad, transformación y efecto farmacológico de los niveles intracelulares del MTX es diferente en todos los tejidos, la magnitud de la citotoxicidad depende de la duración en la supresión de la síntesis de ADN. Las formas poliglutamadas del MTX han sido detectadas en neoplasias y en menor grado en tejidos normales expuestos a MTX, se han encontrado en células leucémicas, células cancerosas hepáticas, hepatocitos, fibroblastos e inhiben el crecimiento de éstos (Schilsky, 1980; Sirotnak, 1980; Jolivet, 1983b; Fabre, 1984; Allegra, 1985).

Aunque la producción aún no está bien establecida, sí están relacionadas que a mayor poliglutamatos mayor citotoxicidad. Las células de la médula ósea y células progenitoras de granulocitos sintetizan principalmente monoglutamatos por lo que la toxicidad es menor (Fabre, 1984; Allegra, 1985). El tejido normal gastrointestinal y la médula ósea producen poliglutamatos de MTX, pero son insuficientes para mantener la función inhibitoria sobre la DHFR, las células tumorales tienen la mayor capacidad de formar poliglutamatos y por lo tanto tienen mayor sensibilidad (Chabner, 1985).

Existen tejidos que tienen mayor capacidad para incorporar ácido fólico o MTX, por ejemplo el hígado compite por el ácido fólico, por eso la permeabilidad diferencial es responsable de la sensibilidad y toxicidad diferencial de los tejidos. Diversos estudios han demostrado que los blancos enzimático son sitios por los que compite el ácido fólico y el MTX para la formación o inhibición de THF, por ello se necesitan altas concentraciones de ácido fólico para revertir el defecto inhibitorio del MTX, esto explica también por qué la administración de ácido fólico después de 4 horas de la administración de MTX no revierte el defecto tóxico; la célula puede tolerar un periodo de inhibición de la reductasa fólica, pero si éste es muy prolongado la llevará a daño irreversible. Cuando se administra una dosis única de MTX, el fármaco entra rápidamente a la célula, produciendo una inhibición de la síntesis de timidina, una menor pero importante inhibición en la síntesis de purinas, seguida de una inhibición moderada en la síntesis de proteínas, pero permite que la síntesis de proteínas continúe, es decir, se altera la multiplicación celular pero la síntesis proteica

continúa incluyendo la síntesis de enzima reductasa fólica, produciendo enzima libre y reanudando los procesos de división celular normal si no se mantiene la administración del fármaco. Por lo que es necesaria una dosis particular de droga que permanezca el tiempo suficiente que se mantenga dentro de la célula para inactivar la enzima durante el periodo crítico y la lleve a daño irreversible. El 5-metil tetrahidrofolato protege a las células normales pero no a las malignas de la toxicidad del MTX (Dudman, 1982; Jolivet, 1983).

El metotrexate también puede ser metabolizado a 7-hidroxi metotrexato en el hepatocito para formar poli-derivados de 7-hidroxiMTX, su metabolito es un inhibidor menos potente de la dihidrofolato reductasa pero contribuye importantemente en la toxicidad (Rhee, 1986; Baggott, 1994).

Estudios previos demuestran que el metotrexate induce la apoptosis de células sanguíneas activas por mitógenos o superantígenos, y puede inducir delección clonal de células T a concentraciones alcanzadas mediante bajas dosis en tratamientos clínicos (Genestier, 1998; Huang, 1999). También se ha asociado al metotrexate como inductor de apoptosis de células T de sangre humana periférica activadas *in vitro*. La apoptosis requirió la progresión de células T activadas en la fase S del ciclo celular, algunos estudios demuestran que el metotrexate puede selectivamente eliminar células T sanguíneas periféricas por una vía independiente a CD95. El metotrexate induce la apoptosis de células mitógenas activas pero no en las que están sin actuar. Los datos indican que el metotrexate a bajas y altas cantidades inhibe la proliferación celular no apoptótica y a concentraciones intermedias disminuye las células viables por vías apoptóticas (Genestier, 1998). Como la inducción de apoptosis por el metotrexate requiere de progresión a la fase S del ciclo celular, la señal de apoptosis por el metotrexate es probablemente iniciada al mismo tiempo que la síntesis del DNA, durante la fase S del ciclo celular. El metotrexate tiene propiedades antiinflamatorias y están mediadas por la liberación de adenosina de diferentes tipos celulares que expresan nucleotidasa ecto-5' favoreciendo la apoptosis. El MTX lleva a apoptosis cuando los niveles de purinas y deoxipurinas caen junto con los niveles de deoxitimidinatrifosfato (Huang, 1999; Genestier, 1998).

El metotrexate puede causar depresión severa de la médula ósea, seguida de anemia, leucopenia y/o trombocitopenia (PLM, 1999). Los cambios megaloblásticos originados por

intoxicación con metotrexate se considera que inician con la elevación de monofosfato de desoxiuridina, debido a metilación deficiente y por lo tanto disminuyendo el paso a monofosfato de desoxitimidina. Parte del monofosfato de desoxiuridina se fosforila y pasa a trifosfato de desoxiuridina, éste se acumula en la célula y durante la síntesis se incorpora al DNA produciendo cadenas defectuosas, en las que la timina está sustituida por uracilo; esta anomalía del DNA es similar a la anemia originada por déficit nutricional de folato y cobalamina (Fauci, 1998).

La supresión medular y la toxicidad gastrointestinal incrementan con la administración combinada de analgésicos no esteroideos. Tiene actividad inmunosupresora, disminuye la resistencia a infecciones (PLM,1999).

Diferentes estudios han reportado evidencia del efecto de dosis bajas del MTX por la vía de la adenosina, el incremento de la adenosina local libre deriva en un efecto antiinflamatorio no esteroideo (Morabito, 1998; Cronstein, 1993). El MTX incrementa importantemente los niveles de adenosina libre de los fibroblastos y células endoteliales. El tratamiento de MTX inhibe la adherencia de los fibroblastos a los neutrófilos estimulados y no estimulados e inhibe la adherencia de los neutrófilos por un incremento en la adenosina libre de los fibroblastos (Cronstein, 1991; Cronstein, 1993).

El MTX inhibe la quimiotaxis y la producción de superóxido en neutrófilos inactivados o activados con factor estimulante de colonias de granulocitos. Además el MTX reduce la adhesión de los neutrófilos hacia la monocapa de células endoteliales, posiblemente por aumento en la producción de adenosina. La adenosina y el MTX atenúan la adhesión celular leuco-endotelial inducida por factor activador de plaquetas en vénulas, por la activación de los receptores A2 de los leucocitos. También dificulta la fagocitosis (Asako 1993; Okuda, 1996; Stromhaug, 1996).

Estudios en cultivos de células de trofoblasto normal se ha observado que el MTX produce cambios morfológicos; se ha reportado un incremento del tamaño nuclear y celular, un incremento de la secreción de la gránulos y vacuolas, se incrementan las microvellosidades con decremento de las vellosidades y un incremento de células multinucleadas. En un estudio realizado en ratas a las que se les administró MTX el número de células trofoblásticas fue significativamente menor (Koide, 1971; Sand, 1986).

Entre las reacciones adversas frecuentes esta la estomatitis ulcerativa, leucopenia, náuseas y distensión abdominal, malestar general, fatiga excesiva, escalofríos, fiebre, letargo y disminución de la resistencia a infecciones (PLM, 1999). La mucositis, náuseas y vómito suceden en el 20% de los casos, la elevación de las enzimas hepáticas es menos frecuente y son raras la irritación ocular, eritema y descamación, pleuritis y oligospermia transicional (Jolivet, 1983b). En caso graves, enteritis hemorrágica y muerte por perforación intestinal. Después de periodos prolongados causa hepatotoxicidad, fibrosis y cirrosis. La enfermedad pulmonar puede empezar de forma aguda en cualquier momento, aun con dosis de apenas 7.5mg/semana (PLM, 1999).

En las ratas desnutridas los niveles de DHFR están reducidos en el hígado y médula ósea y se ha relacionado un incremento de la toxicidad del MTX, aun con restitución aguda de folatos (Grossie, 1982; Haig, 1984).

Afecta la espermatogénesis y la oogénesis, por lo que debe evitarse la concepción durante y 3 meses después de interrumpido el tratamiento. Se han reportado muertes fetales y malformaciones con el uso de metotrexate (PLM, 1999).

La dosificación de metotrexate en ratas en estudios experimentales reporta como dosis máxima 5 gr/kg. Las dosis terapéuticas en los estudios experimentales en ratas van de 2.5-7 mg/kg intraperitoneal. Un estudio en ratones hembra gestantes reportó dosis de metotrexate de 1.25-2.5 mg/kg intraperitoneales, 56% de resorción con dosis de 2.5 mg/kg. Dosis altas de 5-20 mg/kg produjeron embrioletalidad y retardo en el crecimiento fetal (Elmazar,1992; Kröger,1999).

4.4. DEFECTOS AL NACIMIENTO

La interferencia del desarrollo normal por diferentes factores conocidos como teratógenos es en los periodos de mayor división celular y diferenciación rápida por ser los más sensibles. Aunque el producto de la concepción está protegido en el útero, existen agentes teratógenos que pueden incorporarse y ocasionar malformaciones congénitas. Las causas ambientales perturban los procesos embriológicos de un producto con genotipo normal, debido a que durante el despliegue de la instrucción genética las estructuras y órganos están

bajo la influencia de factores micro, matro y macroambientales favorables o no para el desarrollo. El estudio teratológico relaciona los diversos factores genéticos y/o ambientales que interfieren con el desarrollo normal (Attie, 1993; Sadler, 2004; Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

Las enfermedades congénitas van desde las deficiencias enzimáticas por sustitución de un sólo nucleótido hasta complicadas asociaciones anatómicas macroscópicas, por lo que pueden ser estructurales, funcionales, metabólicas o del comportamiento. La patogenia de las anomalías del desarrollo puede ser genética (aneuploidías, estructurales o mutaciones), ambiental (biológicas, químicas o físicas) o la interacción de ambas (Carlson, 2005).

La morbi-mortalidad infantil se ha modificado en los últimos 50 años. La tasa de mortalidad infantil ha descendido el 80%, es decir de 107 a 21.5 por 1000 nacidos vivos y el 8% de las muertes suceden en menores de un año (DGIS. SA, 2004b), observándose una transición de las enfermedades infecciosas por las malformaciones congénitas.

Cerca del 20% de las muertes perinatales se atribuyen a malformaciones congénitas. Las malformaciones pueden ser múltiples o simples, mayores o menores. El 14% de los recién nacidos vivos presenta malformaciones menores simples, la presencia de malformaciones menores simples orienta a la posibilidad de malformaciones menores múltiples o malformaciones mayores; es por ello que el 90% de los neonatos con malformaciones menores múltiples presentará malformaciones mayores. Alrededor del 3% de los neonatos presentan malformaciones mayores al nacimiento y se detecta adicionalmente 3% durante la infancia (Moore y Persaud, 2004; Carlson, 2005).

En México, durante 1999 las malformaciones congénitas ocuparon el 12° lugar de mortalidad general y el segundo en mortalidad infantil, ocupando el 25.7% de las muertes en menores de un año de edad, el 10% de las muertes fetales y el 18% de las muertes neonatales tempranas (DGIS. SA, 2004b). Los embriones con malformaciones mayores son abortados espontáneamente en el 99.5% de los casos y los fetos en el 81.1% (Arteaga et al., 2001).

Lo que es seguro hoy en día es que la interacción del ambiente externo, el matroambiente y el microambiente, interactúan en el desarrollo del nuevo ser. De esta manera un aspecto que

destaca durante la gestación es la nutrición, donde los suplementos han adquirido gran interés como colaboradores en el desarrollo del producto de la concepción.

Uno de los más estudiados es el ácido fólico. Ahora se sabe que puede estar bajo control genético e involucrar una serie de interacciones de genes, nutrientes y enzimas. El potencial del metabolismo anormal de los folatos y el estatus fólico alterado que involucran al polimorfismo genético se han relacionado con aumento en el riesgo de defectos en las extremidades, corazón, sistema urinario, agenesia o hipoplasia de timo, tiroides y paratiroides, labio y/o paladar hendido y anomalías estructurales mayores; también puede incrementar el riesgo de síndrome de Down. Sin embargo, sólo la fuerte relación entre la suplementación de ácido fólico y la reducción de los defectos del tubo neural que va del 60% al 85% se han podido sustentar ampliamente. La variante génica relacionada a la deficiencia en el metabolismo de folatos más estudiada es la MTHFR C677T (Moyers y Bailey, 2001).

4.4.1. MTHFR, ácido fólico, homocisteína y anomalías congénitas

El gen de la 5-10metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se localiza en el cromosoma 1 en el sitio 1p36.3. La MTHFR cataliza la conversión de 5-10-metilenFH₄ a 5-metilFH₄, la forma del folato con mayor circulación y encargada de la metilación de la homocisteína en la síntesis de metionina.

Se han observado variaciones en el gen de MTHFR que se asocian a homocisteinuria y desordenes metabólicos, cánceres, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, infarto, trombosis y otras alteraciones de la coagulación en adultos y a anomalías congénitas (Kluijtmans, 1997; Bailey, 1999).

El alelo C677T es una mutación en la posición 677, cambia una citosina por timina resultando en la sustitución de un aminoácido, alanina a valina. Esta forma es termolábil, debido a que su actividad disminuye 50-60% a 37°C ó más; además se asocia a un estatus de folatos alterado, un mayor requerimiento de ácido fólico y una respuesta alterada a la suplementación (Jacques, 1996; Bailey, 1999; Botto, et al., 2000b; Guinotte, 2003).

Los homocigotos para esta mutación tienen una disminución en la estabilidad y actividad específica de la enzima, un incremento de homocisteína sérica de hasta 40%, un decremento en la concentración de folatos séricos y una concentración menor de folato eritrocitario, especialmente si la ingesta de ácido fólico es suprimida o insuficiente para mantener los niveles séricos de folatos y corregir los niveles de homocisteína en sangre. Los homocigotos tienen una deficiencia en la adaptabilidad ante el déficit de folatos (Moyers y Bailey, 2001).

La deficiencia de los folatos es más evidente en mujeres embarazadas homocigotas a esta mutación que las mujeres embarazadas sin la mutación, lo que sugiere grupos más vulnerables y por lo tanto que requieren de esquemas de suplementación diferente. Aun cuando los heterocigotos no muestran evidencia clínica si se ha observado un incremento del riesgo especialmente cuando se asocia a otros factores de riesgo, por ejemplo para síndrome de Down y pre-eclampsia. Algunos estudios han mostrado que una suplementación con 400 µg/d es suficiente para mantener los niveles de homocisteína y folatos séricos normales (Jacques, 1996; Mohillo, 1997; Bailey, 1999; Botto, et al., 2000b, Kauwell, 2000; Moyers y Bailey, 2001; Guinotte, 2003).

Se ha observado mayor frecuencia de este alelo en la población hispana, italiana y en algunos grupos amerindios. En la población anglo-americana existe una frecuencia de 10-12% del genotipo homocigoto de la mutación, mientras que en la población hispano-mexicana en EU es del 20%, la de mayor prevalencia reportada (Moyers y Bailey, 2001; Guinotte, 2003).

Se ha visto una asociación de la homocigosis de la mutación con un mayor riesgo de defectos al nacimiento principalmente con defectos del tubo neural, pero se ve modificado este riesgo por las condiciones ambientales como son el estado nutricional. La homocigosis materna está asociada con el incremento en el riesgo, pero aumenta importantemente el riesgo cuando madre e hijo son homocigotos para la mutación (Botto, et al., 2000b).

El segundo polimorfismo más frecuente es la MTHFR A1298C, no produce hiperhomocisteinemia y se cree que su efecto depende de la suma con la mutación de MTHFR C677T (Moyers y Bailey, 2001).

4.4.2. Defectos del tubo neural

México tiene alta incidencia de nacidos con defectos del tubo neural (DTN), la frecuencia de nacimientos con defectos como anencefalia, espina bífida y meningocele no ha disminuido y es un problema de salud. México ocupa los primeros lugares en el mundo por anencefalia, espina bífida y encefalocele. En 1998, tuvo la prevalecencia más alta del mundo en anencefalia con 15.8 por 10,000 nacidos vivos. Durante 1994-1997 los defectos del tubo neural ocuparon el segundo lugar como causa de mortalidad (21%), solamente precedidos por las malformaciones congénitas del sistema cardiovascular (42%). Aunque hay una amplia variedad temporal y geográfica 8 de cada 10 casos de defectos del tubo neural se encuentran en la zona centro del país (Ramírez, 2003).

En un estudio realizado en mujeres que previamente habían tenido niños con defectos del tubo neural se encontró un desorden en el metabolismo de la homocisteína por un defecto en la remetilación hacia metionina produciendo hiperhomocisteína e intolerancia a la metionina, que puede ser corregida con alta dosis de ácido fólico, vitamina B₆ y B₁₂ (Stegers, 1994).

Se ha demostrado que la suplementación con multivitamínicos periconcepcionales que contengan ácido folio puede reducir la incidencia de DTN. Pero se requiere de la suplementación por lo menos un mes antes de la concepción hasta el segundo mes de gestación; el mecanismo protector aún no es bien entendido (Czeizel, 1995; Kirke, 1996), pero la ingesta diaria periconcepcional de 0.4 mg de ácido fólico reduce la ocurrencia de defectos del tubo neural en 60% ó más (Werler et al., 1999).

Varios estudios han reportado asociación entre los homocigotos de la mutación C677T del gen de la MTHFR y un incremento en el riesgo de los DTN de 3 a 7 veces (Ou, 1996; Kirke, 1996; Vander Put, 1998; Botto, 2000b; Martínez et al., 2001). En un estudio realizado en EU, la mutación fue levemente más frecuente en los casos con DTN y fue más frecuente en los casos y controles de hispanos, aunque el riesgo de DTN es igual en población de hispanos y no hispanos aún cuando la mutación es más frecuente entre los primeros. También se observó un leve riesgo de espina bífida asociado a los homocigotos TT de la mutación (Shaw, 1998). Un estudio realizado en fibroblastos de fetos con defectos del tubo neural mostró que la homocigosis C677T está asociada con 7.2 veces mayor riesgo

de defectos del tubo neural. Por lo que el polimorfismo del gen de la MTHFR es un factor de riesgo y explica en parte por qué el ácido fólico previene los defectos del tubo neural (Ou, 1996). Un estudio de casos y controles mostró que los homocigotos para la mutación C677T de la MTHFR se ha asociado con un incremento de dos veces mayor riesgo para defectos del tubo neural, mientras que los homocigotos para la mutación de la cistationina-βsintetasa no es un factor de riesgo, pero los individuos con ambas mutaciones tienen cinco veces mayor riesgo, lo que sugiere que la interacción gen-gen juega un rol importante en la modulación de la susceptibilidad para defectos del tubo neural (Botto,1998; Botto, 2000b). Incluso se ha estimado que el 12% de los defectos del tubo neural en la población irlandesa se debe a la mutación C677T de la MTHFR (Kirke, 1996; Shaw, 1998). Otra mutación de la MTHFR se ha asociado con defectos del tubo neural, los homocigotos a la A1298C y los heterocigotos de esta mutación más la mutación C677T presentan un factor de riesgo genético adicional para defectos del tubo neural (Van der Put, 1998).

La MTHFR es la enzima llave para la regulación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína y mantiene una adecuada reserva intracelular de metionina, aminoácido que puede ser esencial en la protección de los embriones contra los DTN. Parece que el genotipo mutante en el infante participa más en el riesgo de los DTN, pero es aún controversial. Algunos autores refieren que el efecto de la suplementación es sobre el metabolismo materno y no sobre el feto, otros mencionan que la madre solo aporta un riesgo adicional y el efecto de la suplementación es sobre el riesgo de patogénesis en los fetos con la mutación, finalmente algunos consideran que la asociación de ambos genotipos están involucrados (Shaw, 1998; Shields, 1999). Un estudio realizado en ratones sugiere la relación de Pax-3 (factor que regula N-CAM, caderinas, MyoD, Myf-5) y ácido fólico en el desarrollo de DCTN (Fleming, 1998).

4.4.3. Cardiopatías congénitas

La primera causa de muerte neonatal temprana son las malformaciones del corazón, mientras que en los neonatos tardíos ocupa el tercer lugar y en las muertes fetales el séptimo lugar (DGIS.SA, 2004b). Las malformaciones congénitas del corazón en los neonatos ocupan el 1° lugar, mientras que los defectos del tubo neural el cuarto. En los

postneonatos las cardiopatías ocupan el tercer lugar y de los defectos del tubo neural sólo aparece la espina bífida en el lugar 16. Finalmente, las malformaciones congénitas del corazón ocuparon el tercer lugar como causa de mortalidad infantil en México en el 2002, mientras que los defectos del tubo neural como la anencefalia ocuparon el séptimo lugar. Los estados que han reportado mayor número de defunciones por cardiopatía congénita son el Distrito Federal, Guanajuato, el Estado de México y Puebla (DGIS.SA, 2004a).

En un hospital general de tercer nivel se identificó la incidencia de malformaciones en 30.9 por 1000 NV, el 34% de los defectos fueron cardiovasculares y el 9% murieron en etapa perinatal; sólo 10% fueron atribuidas a teratógenos (Vega y Vizzuett, 2005). En el Hospital General de México se observó por aparatos y sistemas, a las malformaciones del corazón en cuarto lugar, pero por tipo de afección en el tercer lugar (Ortiz, 2003).

En un estudio de casos y controles realizados en Atlanta se observó la asociación de factores de riesgo con los defectos al nacimiento. Las cardiopatías congénitas presentaron una exposición variable a los factores de riesgo. Algunos con los que se observó asociación fueron fiebre, diabetes mellitus, tranquilizantes, hipertensión arterial, estrés y gripa materna. También se ha mostrado una asociación con el incremento de la edad materna (Erickson, 1991).

Debido a que las cavidades cardíacas están formadas por diferentes segmentos embrionarios, éstos determinan las diferentes cardiopatías congénitas. En los ventrículos se presentan las del tracto de entrada, de la porción trabecular apical y/o del tracto de salida. La identificación morfológica es importante en los defectos de canal atrioventricular. Por ejemplo, la orientación de las aurículas orienta a identificar el situs solitus, el situs inverso y la heterotaxia (isomerismo derecho o izquierdo), mientras que los ventrículos se reconocen por sus características apicales, útiles en las conexiones atrioventriculares discordantes y en el situs inversus. La discordancia atrioventricular existe cuando el atrio morfológicamente derecho se conecta con el ventrículo morfológicamente izquierdo y el atrio izquierdo se conecta al ventrículo derecho. Ambos casos se pueden encontrar en situs solitus o inversus (Attie, 1993; de la Cruz et al., 2001).

Las cardiopatías producidas por defectos de los cojines endocárdicos son defectos septales y canal atrioventricular común. Estas alteraciones se caracterizan por la presencia de un

anillo atrioventricular único y defectos septales en las cuatro cámaras que se comunican entre si. Probablemente resulta de una detención en el crecimiento del cojín inferior, dado que es el que participa predominantemente en la septación atrioventricular. Otras alteraciones causadas por falla de los cojines son la atresia o estenosis tricúspidea o mitral, y la doble entrada ventricular. El flujo sanguíneo es un importante factor morfogenético del desarrollo normal, por ejemplo la atresia de la válvula tricúspide impedirá el flujo al ventrículo derecho por lo que se formará un ventrículo rudimentario e incompleto (de la Cruz et al., 2001; Carlson, 2005).

Una falla en la incorporación o tabicación del tracto de salida al ventrículo izquierdo ocasiona doble salida del ventrículo derecho o que una de las arterias cabalque sobre el tabique interventricular, como la aorta en la tetralogía de Fallot. Si el tracto de salida no se tabica se forma un tronco arterioso único. Otra alteración en el tracto de salida es la transposición de las arterias en la que la aorta nace del ventrículo derecho y la arteria pulmonar del ventrículo izquierdo, esta alteración es conocida como discordancia ventrículo arterial (Attie, 1993; de la Cruz et al., 2001).

El desarrollo anormal de dos o más segmentos cardiacos originará cardiopatías complejas, por ejemplo el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, en el que fallaron tres segmentos.

Las cardiopatías asociadas con ablación de las células de la cresta neural antes de su migración son la persistencia del tronco arterioso, doble salida del ventrículo derecho, tetralogía de Fallot, diversas alteraciones de las arterias derivadas de los arcos aórticos como interrupción del arco aórtico, ausencia del conducto arterioso o persistencia del conducto arterioso. Las alteraciones del tracto de salida con falla en la migración de las células de la cresta neural se dividen en dos grupos: la ausencia de tabicación (persistencia del tronco arterioso) o un defecto en la alineación del septo (doble salida ventricular). El canal atrioventricular y la transposición de las grandes arterias son raras en la ablación de las crestas neurales (de la Cruz et al., 2001; Carlson, 2005).

5. METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1. MATERIAL

5.1.1.1. Material biológico

- Ratas Wistar hembras, nulíparas, de \pm 250 gramos de peso
- Ratas Wistar machos, de más de 300 gramos de peso

5.1.1.2. Tamaño de la muestra

- Cincuenta y cinco ratas Wistar hembras
- Ocho ratas Wistar machos

5.1.1.3. Reactivos y soluciones

- Éter etílico (éter anhidro) J.T. Baker 9244-01. Lote Y12C60
- Formaldehído en solución al 37%. J.T. Baker 2106-02. Lote K48455
- Fosfato de sodio dibásico anhidro Baker
- Fosfato de sodio monobásico Baker
- Metotrexate. Ledertrexate. Polvo para solución inyectable. Frasco ampula con polvo liofilizado amarillo de metotrexate sódico de 50 mg para 20 ml de solución.
- Solución salina inyectable. Solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%. Abbott México. Lote 09538RC3.

5.1.1.4. Aparatos

- Balanza analítica.
- Balanza electrónica digital Sartorius con escala en miligramos
- Balanza granatoria para pesaje de roedores
- Calibrador Vernier Scala, con graduación en décimas de milímetro
- Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 990

- Cámara fotográfica Nikon F-3 de 35 mm con objetivo Micronikor de 55 mm
- Computadora PC. HP 1125LA 512 MB
- Equipo Multiphot Nikon de macro-microfotografía
- Impresora de inyección de tinta. HP deskjet 657
- Lámpara de fibra óptica Nikon (Hight Intensity Illuminator) NI-150
- Microscopio estereoscópico binocular Nikon SMZ-10 con ocular micrométrico

5.1.1.5. Cristalería y material diverso

- CD's para computadora
- Cristalería (vasos de precipitados, cajas de Petri, etc.)
- Cubrebocas
- Diskettes de 3.5" para computadora
- Guantes de asbesto (para manejo de roedores)
- Guantes quirúrgicos
- Instrumental de microcirugía
- Jeringas desechables de insulina
- Papelería y material de oficina
- Película Ilford-PanF50 de 35 mm
- Portaobjetos de 50 x 22 mm

5.1.2. MÉTODO

5.1.2.1. Tipo de investigación: Experimental, prospectiva y transversal

5.1.2.2. Criterios de selección

5.1.2.2.1. Criterios de inclusión

- Ratas Wistar hembra sanas nulíparas de \pm 250 gramos de peso
- Ratas Wistar macho sanos de más de 300 gramos de peso

5.1.2.2.2. Criterios de exclusión

- Ratas hembras con ciclo estral irregular
- Ratas hembras que no resulten gestantes
- Ratas con enfermedad previa al inicio del tratamiento

5.1.2.2.3. Criterios de eliminación

- Que las ratas adquieran alguna enfermedad no atribuible al uso de la sustancia en investigación
- Ratas que mueran durante el tratamiento

5.1.2.3. Variables

5.1.2.3.1. Independientes

- Dosis de metotrexate
- Día del desarrollo en que aplica la dosis

5.1.2.3.2. Dependientes

- Peso y talla de los fetos
- Frecuencia de malformaciones cardiacas congénitas en los fetos
- Tipo de malformación cardiaca congénita en los fetos
- Frecuencia y tipo de malformaciones no cardiacas en los fetos

5.1.2.4. Escalas de medición

- Para variables no paramétricas (frecuencia y tipo de malformaciones) la escala es cualitativa
- Para las variables paramétricas (peso y talla) la escala es cuantitativa

5.1.2.5. Fecundación

Durante un periodo de 1 a 2 semanas, las ratas hembras debidamente marcadas para su identificación, fueron mantenidas en observación, con control diario de peso, y

alimentación *ad libitum* en las instalaciones del Bioterio del Hospital. Este periodo se realizó para que los animales se habituaran a la manipulación de los investigadores.

Al concluir esta etapa de iniciación, mediante frotis vaginal diario se determinó el ciclo estral de cada rata. En la etapa de proestro, las ratas se colocaron con el macho y se dejaron por 24 horas, al cabo de las cuales se realizó un nuevo frotis para confirmar la presencia de espermatozoides, considerándose este momento como el día 0 de la gestación, separándose del macho. Se realizó frotis vaginal a la rata durante 7 días más para confirmar la gestación. El control del peso se realizó diariamente hasta el final del experimento (ANEXO 1 y 2).

5.1.2.6. Diseño experimental

Las ratas gestantes fueron aleatoriamente distribuidas en 5 grupos:

- 1) **Grupo 1 ó Control Ambiental** (n = 5): A estas ratas no se les aplicó ninguna sustancia, manteniéndose en las mismas condiciones de bioterio que los otros grupos
- 2) **Grupo 2 ó de Control de Inyección** (n = 5): A estas ratas se les aplicó, el 12° día de gestación, una inyección intraperitoneal de 0.5 ml de diluyente para liofilizado de metotrexate

Los grupos experimentales se dividieron en 3 de acuerdo al día de inyección, y cada grupo a su vez se dividió en 3 subgrupos según la dosis administrada (cada subgrupo se integró por 5 ratas), quedando de la siguiente manera:

- 3) **Grupo 3** (n = 15): A estas ratas se les aplicó el 9° día de gestación una dosis única intraperitoneal de metotrexate a concentración de 0.12 mg/kg, 0.25 mg/kg ó 0.5 mg/kg (subgrupos 3A, 3B y 3C, respectivamente)
- 4) **Grupo 4** (n = 15): A estas ratas se les aplicó el 10° día de gestación una dosis única intraperitoneal de metotrexate a concentración de 0.12 mg/kg, 0.25 mg/kg ó 0.5 mg/kg (subgrupos 4A, 4B y 4C, respectivamente)
- 5) **Grupo 5** (n = 15): A estas ratas se les aplicó el 12° día de gestación una dosis única intraperitoneal de metotrexate a concentración de 0.12 mg/kg, 0.25 mg/kg ó 0.5 mg/kg (subgrupos 5A, 5B y 5C, respectivamente)

Una vez inyectadas, las ratas se mantuvieron en el bioterio con alimentación e hidratación *ad libitum* hasta que alcanzaron los 21 días de gestación.

5.1.2.7. Preparación de soluciones

Se emplearon ampulas de 50 mg de metotrexate liofilizado para 20 ml de solución inyectable, a partir de las cuales se calculó la dosis en mililitros a administrar de acuerdo al peso de cada rata.

5.1.2.8. Recolección de los fetos

Cuando las ratas cumplieron 21 días de gestación, fueron anestesiadas por inhalación de éter y mediante operación cesárea se extrajeron los fetos vivos y muertos de los cuernos uterinos. Se registró el número de fetos vivos, muertos y reabsorciones de cada una de las camadas (ANEXO 2). Una vez obtenidos los fetos se colocaron en solución de formaldehído al 10% y la rata madre fue sacrificada por sobredosisación de éter. Se obtuvieron los cuernos uterinos y se valoró la presencia de alteraciones uterinas.

5.1.2.9. Análisis de los fetos

Después de 24 horas de fijación, se obtuvieron fotografías de los fetos por camada. Bajo un microscopio estereoscópico, el fenotipo de los fetos fue valorado cualitativa y cuantitativamente (pesados y medidos en su longitud coronilla-rabadilla) (ANEXO 3). A los fetos con alteraciones externas se les realizó registro fotográfico. Posteriormente se extrajo el bloque cardio-pulmonar, el cual se terminó de fijar por inmersión en formaldehído al 10%. El resto de las vísceras se analizaron subsecuentemente, fotografiándose sí presentaban alteraciones. En seguida se disecó el corazón y grandes vasos, analizándose externamente; inmediatamente después se hizo un corte cuatro cámaras para analizar las estructuras internas (ANEXO 3). Los corazones con alteraciones fueron registrados fotográficamente. Se midió con objetivo micrométrico estructuras anatómicas de algunos corazones para establecer si se encontraban en parámetros normales o si eran hipoplásicas (tabique auricular y aorta).

5.1.2.10. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de X^2 para variables no paramétricas (frecuencia de malformaciones) y T de Student para las variables paramétricas (peso y talla), correlación paramétrica y no paramétrica, ANOVA para la comparación entre los grupos. Realizada con el programa SPSS para windows versión 12 (Ferrán, 2001).

5.1.2.11. Consideraciones éticas

Dado que se trata de una investigación experimental en animales de laboratorio, se siguieron todas las indicaciones que marca la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, Título Séptimo: de la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación; así como Título Octavo: de las medidas de seguridad.

5.1.2.12. Consideraciones de bioseguridad

Si bien no se realizó ningún procedimiento de peligrosidad, dado que se manejaron sustancia de conocido efecto nocivo para la salud, tales como el metotrexate y el formaldehído, se tomaron las medidas necesarias de protección para los participantes del proyecto y para todo el personal que laboraba en los laboratorios donde se realizaron los diferentes pasos de la investigación (Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, y Bioterio del Hospital), tales como:

- Información completa sobre el protocolo de investigación y de las sustancias que se emplearon,
- Información detallada de los efectos tóxicos y teratogénicos conocidos del metotrexate, así como de las medidas de emergencia a utilizar en caso de ingestión o inoculación accidental,
- Entrenamiento a los participantes, según su grado de competencia en la investigación, del manejo de las ratas de laboratorio, así como de la determinación del ciclo estral, día de inicio de la gestación y técnica de administración intraperitoneal en las ratas,
- Utilización de un local o laboratorio en adecuadas condiciones de higiene y ventilación para realizar el experimento,

- Dotación de cubrebocas y guantes de protección para el manejo de roedores a todos los participantes,
- El medicamento fue preparado previa administración a todas las ratas, eliminando inmediatamente el sobrante con un manejo adecuado para su desecho,
- La operación cesárea de las ratas madres al día 21 de gestación fue realizada bajo anestesia general por el investigador responsable, cuidando del adecuado manejo y fijación de los fetos,
- Las ratas madre fueron sacrificada de acuerdo a las normas establecidas para este fin en el Bioterio del Hospital, y finalmente
- Las excretas de las ratas fueron desechadas de forma convencional ya que no representaban ningún riesgo de toxicidad.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. RATAS MADRES

6.1.1. Peso total ganado

El promedio de peso total ganado por las ratas madres en cada grupo fue: 118.04 g en el **grupo 1** ó control, 101.54 g en el **grupo 2** ó de control de inyección, 66.46 g en el **grupo 3** ó de inyección en el 9° día, 62.94 g en el **grupo 4** ó de inyección en el 10° día, y 80.38 g en el **grupo 5** ó de inyección en el 12° día (Tabla 1, gráfico 1). Los grupos 3 y 4 (de inyección en el 9° y 10° día) presentaron mayor diferencia con el grupo control por la prueba de T de Student ($t = 4.54 / p = 0.000$ y $t = 3.53 / p = 0.002$, respectivamente) y de ANOVA ($p = 0.010$ y 0.005 , respectivamente).

De acuerdo a la dosis administrada, los promedios de peso ganado fueron: 109.79 g para la dosis de 0.00 mg/kg (grupos 1 y 2: control y de inyección salina), 89.52 g para los grupos experimentales 3, 4 y 5 a dosis de 0.12 mg/kg, 64.22 g para los grupos 3, 4 y 5 a dosis de 0.25 mg/kg y 56.05 g para los grupos experimentales 3, 4 y 5 a dosis de 0.50 mg/kg (gráfico1), siendo las diferencias más importantes con las dosis de 0.25 y 0.50 mg/kg en la prueba de T de Student ($t = 4.69 / p = 0.000$ y $t = 4.8 / p = 0.000$, respectivamente) y de ANOVA ($p = 0.001$ y 0.000 , respectivamente).

6.1.2. Alteraciones maternas

Se presentaron 11 casos de alteraciones maternas durante la cesárea, que corresponde al 20% de las ratas madre (Tabla 1). En el **grupo 1** (control) se presentó un caso, en el **grupo 2** (de inyección salina) 0 casos, en el **grupo 3** (de inyección el 9° día) cinco casos, en el **grupo 4** (de inyección el 10° día) tres casos y en el **grupo 5** (de inyección el día 12° día) dos casos. Por dosis administrada, fueron: a dosis de **0.0 mg/kg** un caso, a dosis de **0.12 mg/kg** tres casos, a dosis de **0.25 mg/kg** dos casos, y a dosis de 0.5 mg/kg cinco casos (Tabla 1). Las alteraciones se presentaron principalmente en el 9° día y a dosis de **0.50 mg/kg**, pero sin diferencia significativa. Las alteraciones maternas encontradas consistieron en hemorragias, fundamentalmente uterinas.

6.2. FETOS OBTENIDOS

6.2.1. Frecuencias

Se obtuvieron de todas las camadas: 352 fetos vivos, 23 fetos muertos y 207 reabsorciones. De los 352 fetos vivos obtenidos 271 fueron normales y 81 presentan alguna alteración externa (Tabla 2). Así mismo, de los fetos vivos 165 (46.9%) fueron hembras y 187 machos (53.1%) (Tabla 3).

Por grupo se obtuvieron (Tabla 2): En el **grupo 1** (control) 54 fetos vivos (52 normales y 2 anormales por hipotrofia), 0 fetos muertos y 9 reabsorciones; en el **grupo 2** (de inyección salina) 47 fetos vivos (46 normales y 1 anormal por hipotrofia), 2 fetos muertos y 4 reabsorciones; en el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) 87 fetos vivos (49 normales y 38 anormales), 14 fetos muertos y 64 reabsorciones; en el **grupo 4** (de inyección en el 10° día) 66 fetos vivos (45 normales y 21 anormales), 6 fetos muertos y 83 reabsorciones; y en el **grupo 5** (de inyección en el día 12) 98 fetos vivos (79 normales y 19 anormales), 1 feto muerto y 47 reabsorciones (Gráfico 2A y 2B).

Por dosis administrada (Tabla 2): A dosis de **0.0 mg/kg (grupos 1 y 2)** se obtuvieron 101 fetos vivos (98 normales y 3 anormales por hipotrofia), 2 muertos y 13 reabsorciones; a dosis de **0.12 mg/kg** se obtuvieron 121 fetos vivos (97 normales y 24 anormales), 4 muertos y 34 reabsorciones; a dosis de **0.25 mg/kg** se obtuvieron 72 fetos vivos (41 normales y 31 anormales), 8 muertos y 69 reabsorciones; y a dosis de **0.5 mg/kg** se obtuvieron 58 fetos vivos (35 normales y 23 anormales), 9 muertos y 91 reabsorciones.

En cuanto al número de camadas que presentaron fetos anormales o el 100% de reabsorciones, se encontró que en el **grupo 1** (control) sólo una camada presentó fetos anormales (2 fetos con hipotrofia). En el **grupo 2** (de inyección salina) se presentó también sólo una camada afectada con un feto anormal (hipotrófico) (Figura 5). En el **grupo 3 a dosis de 0.12 mg/kg** se encontraron dos camadas con fetos anormales (12 fetos); a **dosis de 0.25 mg/kg** hubo cuatro camadas con fetos anormales (15 fetos); y a **dosis de 0.50 mg/kg** tres camadas presentaron fetos anormales (11 fetos) y una camada presentó 100% de reabsorciones. En el **grupo 4 a dosis de 0.12 mg/kg** tres camadas presentaron fetos anormales (9 fetos); a **dosis de 0.25 mg/kg** tres camadas presentaron fetos anormales (8

fetos) y las otras dos camadas presentaron reabsorciones en el 100% de los casos; a **dosis de 0.50 mg/kg** dos camadas presentaron fetos afectados (4 fetos) y tres camadas presentaron reabsorciones en el 100% de los casos. En el **grupo 5 a dosis de 0.12 mg/kg** una camada presentó fetos anormales (3 fetos); a **dosis de 0.25 mg/kg** cuatro camadas presentaron fetos anormales (8 fetos); y a **dosis de 0.5 mg/kg** tres camadas presentaron fetos anormales (8 fetos) y una camada presentó el 100% de reabsorciones (Figuras 6-12).

El promedio por camada de fetos obtenidos en el **grupo 1** (control) fue de 10.8 fetos vivos, 0 fetos muertos y 1.8 reabsorciones; en el **grupo 2** (de inyección salina) fue de 9.4 fetos vivos, 0.4 fetos muertos y 0.8 reabsorciones; en el **grupo 3** (de inyección en el día 9° día) fue de 5.8 fetos vivos, 0.9 fetos muertos y 4.3 reabsorciones; en el **grupo 4** (de inyección en el 10° día) fue de 4.4 fetos vivos, 0.4 fetos muertos y 5.5 reabsorciones; y en el **grupo 5** (de inyección en el 12° día) fue de 6.5 fetos vivos, 0.07 fetos muertos y 3.1 reabsorciones (Gráfico 3A y 3B). El número total y promedio por grupo/dosis de la muestra obtenida se muestra en la Tabla 2 y gráfico 4.

6.2.1.1. Análisis de la Prueba T

La comparación entre los **grupos 1 y 2** (control vs. inyección salina) no mostró diferencias significativas ni para el peso total ganado por las madres ($t = 1.13$, $p = 0.28$) ni para el número de alteraciones maternas ($\text{Chi}^2 = 3.3$, $p = 0.50$). Los valores de t para igualdad de varianzas para el número de fetos obtenidos fueron: para el número total de fetos vivos $t = 0.72$ ($p = 0.48$), para el número de fetos vivos normales $t = -0.60$ ($p = 0.56$), para el número de fetos vivos anormales $t = -0.44$ ($p = 0.66$), para el número de fetos muertos $t = -1$ ($p = 0.34$), y para el número de reabsorciones $t = 1.21$ ($p = 0.26$).

La comparación entre los **grupos 1 y 3** (control vs. inyección en el 9° día) presentó diferencias en el número de fetos vivos, fetos normales y peso total ganado por las madres, sin diferencias en el número de fetos anormales, fetos muertos, reabsorciones y alteraciones maternas. Los valores de t para igualdad de varianzas en el número de fetos obtenidos fueron: para el número total de fetos vivos $t = 2.98$ ($p = 0.008$), para el número de fetos vivos normales $t = 3.93$ ($p = 0.001$), para el número de fetos anormales $t = -1.74$ ($p = 0.098$), para el número de fetos muertos $t = -1.42$ ($p = 0.17$) y para el número de

reabsorciones $t = -1.63$ ($p = 0.12$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 4.54$ ($p = 0.00$) y para el número de alteraciones maternas $\text{Chi}^2 = 3.3$ ($p = 0.50$).

Los **grupos 1 y 4** (control vs. inyección en el 10° día) presentaron diferencias en el número de fetos vivos, fetos normales y peso total ganado por las madres, sin diferencias en el número de fetos anormales, fetos muertos, reabsorciones ni alteraciones maternas. Los valores obtenidos para igualdad de varianzas fueron: en el número de fetos vivos $t = 3.24$ ($p = 0.004$), en el número de fetos vivos normales $t = 3.99$ ($p = 0.001$), en el número de fetos anormales $t = -1.28$ ($p = 0.21$), en el número de fetos muertos $t = -0.96$ ($p = 0.34$) y para el número de reabsorciones $t = -1.90$ ($p = 0.07$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 3.53$ ($p = 0.002$) y para el número de alteraciones maternas $\text{Chi}^2 = 3.3$ ($p = 0.50$).

La comparación entre los **grupos 1 y 5** (control vs. inyección en el 12° día) mostró diferencias en el número de fetos vivos, fetos normales y peso total ganado por las madres, sin diferencias en el número de fetos anormales, fetos muertos, reabsorciones ni alteraciones maternas. Los valores obtenidos para igualdad de varianzas fueron: en el número total de fetos vivos $t = 2.45$ ($p = 0.02$), en el número de fetos vivos normales $t = 2.88$ ($p = 0.010$), en el número de fetos anormales $t = -1.15$ ($p = 0.26$), en el número de fetos muertos $t = -0.56$ ($p = 0.57$) y en el número de reabsorciones $t = -1.38$ ($p = 0.18$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 2.53$ ($p = 0.02$) y para el número de alteraciones maternas $\text{Chi}^2 = 3.3$ ($p = 0.50$).

La comparación por dosis administrada entre la dosis de **0.00 mg/kg (grupo 1 y 2: control e inyección salina)** y los que recibieron **dosis de 0.12 mg/kg** mostró diferencias en el número de fetos vivos normales, sin diferencias en el número total de fetos vivos, fetos anormales, fetos muertos, reabsorciones, alteraciones maternas y peso total ganado en las madres. Los valores obtenidos para igualdad de varianzas fueron: en el número total de fetos vivos $t = 1.79$ ($p = 0.08$), en el número de fetos vivos normales $t = 2.53$ ($p = 0.019$), en el número de fetos anormales $t = -1.73$ ($p = 0.097$), en el número de fetos muertos $t = -0.26$ ($p = 0.79$) y en el número de reabsorciones $t = -1.65$ ($p = 0.11$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 1.91$ ($p = 0.068$) y para el número de alteraciones maternas $\text{chi}^2 = 2.7$ ($p = 0.43$).

La comparación por dosis administrada entre la dosis de **0.00 mg/kg (grupo 1 y 2: control e inyección salina)** y los que recibieron **dosis de 0.25 mg/kg** mostró diferencias en el número total de fetos vivos, fetos vivos normales, fetos anormales, reabsorciones y peso total ganado en las madres, sin diferencias en el número de fetos muertos y alteraciones maternas. Los valores obtenidos para igualdad de varianzas fueron: en el número total de fetos vivos $t = 4.04$ ($p = 0.001$), para el número de fetos vivos normales $t = 5.01$ ($p = 0.000$), para el número de fetos anormales $t = -2.65$ ($p = 0.014$), para el número de fetos muertos $t = -0.94$ ($p = 0.35$) y para el número de reabsorciones $t = -3.03$ ($p = 0.006$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 4.69$ ($p = 0.000$) y para el número de alteraciones maternas $\chi^2 = 2.7$ ($p = 0.43$).

Finalmente, la comparación por dosis administrada entre la dosis de **0.00 mg/kg (grupo 1 y 2: control e inyección salina)** y los que recibieron **dosis de 0.50 mg/kg** mostró diferencias en el número total de fetos vivos, fetos vivos normales, reabsorciones y peso total ganado por las madres, sin diferencias en el número de fetos anormales, fetos muertos y alteraciones maternas. Los valores obtenidos para igualdad de varianzas fueron: en el número total de fetos vivos $t = 4.32$ ($p = 0.000$), para el número de fetos vivos normales $t = 5.92$ ($p = 0.000$), para el número de fetos anormales $t = -1.93$ ($p = 0.065$), para el número de fetos muertos $t = -0.84$ ($p = 0.40$) y para el número de reabsorciones $t = -3.73$ ($p = 0.001$). Para el peso total ganado por las madres el valor fue $t = 4.80$ ($p = 0.000$) y para el número de alteraciones maternas $\chi^2 = 2.7$ ($p = 0.43$).

6.2.1.2. Pruebas de Asociación

La asociación de acuerdo a la dosis encontró relación inversa con el número total de fetos vivos (Pearson -0.559 , $p = 0.000$), fetos normales (Pearson -0.587 , $p = 0.000$) y el peso total ganado (Pearson -0.57 , $p = 0.000$). Mientras que la relación positiva de la dosis fue con el número de reabsorciones (Pearson 0.543 , $p = 0.000$), fetos muertos (Pearson 0.15 , $p = 0.24$), fetos anormales (Pearson 0.16 , $p = 0.23$) y alteraciones maternas (Spearman 0.17 , $p = 0.21$), aunque solamente las reabsorciones fueron significativas.

De acuerdo al grupo asignado, la relación fue inversa y significativa en el total de peso ganado por las madres (Pearson -0.294 , $p = 0.029$), fetos vivos (Pearson -0.317 , $p = 0.018$)

y fetos normales (Pearson -0.339 , $p = 0.011$). El grupo asignado tuvo relación positiva, no significativa, con las reabsorciones (Pearson 0.19 , $p = 0.165$) y fetos anormales (Pearson 0.110 , $p = 0.425$). También se encontró correlación inversa no significativa entre el grupo asignado y el número de fetos muertos (Pearson -0.10 , $p = 0.46$) y las alteraciones maternas (Spearman -0.059 , $p = 0.66$). Se muestran la tabla de correlación Eta para dosis/grupo asignado en la Tabla 4.

6.2.1.3. Prueba de ANOVA

La prueba de varianza de medias mostró diferencia significativa en el promedio de fetos vivos en el **grupo 1** (control) vs. el **grupo 4** (inyección en el 10° día) ($p = 0.010$), y en el número de fetos normales entre el **grupo 1** (control) con los **grupos 3 y 4** (inyección en el 9° y 10° día) ($p = 0.004$ y 0.002 respectivamente), con el **grupo 5** (inyección en el 12° día) la diferencia no fue significativa ($p = 0.066$). También se encontró diferencia en el número total de fetos vivos entre el **grupo 1** (control) y el **grupo 3** (inyección en el 9° día), así como para las reabsorciones entre el **grupo 2** (de inyección salina) y el **grupo 4** (inyección en el 10° día), pero no fueron significativas. No hubo diferencias significativas en el número de fetos muertos entre el grupo 1 (control) y los grupos experimentales.

De acuerdo a la dosis, se encontró diferencia en el número total de fetos vivos entre el **grupo 1** (control) y los grupos que recibieron **dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg** ($p = 0.001$ y 0.000 , respectivamente). La misma situación fue observada en las reabsorciones entre estos grupos ($p = 0.029$ y 0.001 , respectivamente), así como en el número de fetos normales ($p = 0.000$ en ambos casos). El número de fetos muertos y fetos anormales no mostró diferencias entre dosis.

De acuerdo a los grupos/dosis no se encontró diferencia entre el **grupo 1** (control) y los grupos a **dosis de 0.12 mg/kg** del número total de fetos vivos, fetos muertos y reabsorciones. A **dosis de 0.25 mg/kg** se encontró diferencia entre los grupos: en el número total de fetos vivos y reabsorciones del **grupo 1** (control) contra el **grupo 4** (inyección en el 10° día) ($p = 0.008$ y 0.009 , respectivamente). A **dosis de 0.5 mg/kg** se observó diferencia entre los grupos: en el número total de fetos vivos del **grupo 1** (control) contra los **grupos 3 y 4** (inyección en el 9° y 10° día) ($p = 0.031$ y 0.008 , respectivamente) y en las

reabsorciones entre el **grupo 1** (control) con el **grupo 4** (inyección en el 10° día) ($p = 0.046$), mientras que para el número de fetos muertos no hubo diferencias. El número de fetos normales en todos los **grupos experimentales** fueron diferentes entre si y con el **grupo 1** (control) a dosis de 0.5 mg/kg ($p = 0.001, 0.001, 0.022$ respectivamente), a dosis de 0.25 mg/kg con los grupos 3 y 4 (inyección en el 9° y 10° día) ($p = 0.005$ y 0.003 , respectivamente), mientras que a dosis de 0.12 mg/kg no son diferentes entre si los grupos. El número de fetos anormales no mostró diferencias entre los grupos ni entre las dosis.

6.2.2. Características fetales

6.2.2.1. Peso y talla

El peso promedio obtenido fue de 3.76 g y la talla de 3.37 cm para toda la muestra (Tabla 5). Por grupo asignado, el peso para el **grupo 1** (control) fue de 3.67 g y la talla de 3.32 cm; para el **grupo 2** (de inyección salina) el peso fue de 4.34 g y la talla de 3.49 cm; para el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) el peso fue de 3.50 g y la talla de 3.34 cm; para el **grupo 4** (de inyección al 10° día) el peso fue de 3.71 g y la talla de 3.35 cm y para el **grupo 5** (de inyección el 12° día) el peso fue de 3.81 g y la talla de 3.41 cm. Las medias de peso y talla de los fetos por grupo/dosis se muestran en la Tabla 5 y gráfico 5.

Por dosis administrada, en los **grupos 1 y 2** (control y de inyección salina) el peso fue de 3.98 g y la talla de 3.40 cm; a **dosis de 0.12 mg/kg** el peso fue de 3.70 g y la talla de 3.36 cm; a dosis de **0.25 mg/kg** el peso fue de 3.86 g y la talla de 3.45 cm y finalmente, a **dosis de 0.50 mg/kg** el peso fue de 3.38 g y la talla de 3.27 cm.

6.2.2.1.1. Análisis de la prueba T para peso y talla

La prueba T de comparación de medias por grupo asignado encontró diferencia en el peso y talla entre el **grupo 1** (control) y el **grupo 2** (de inyección salina) ($t = -5.03, p = 0.000$ y $t = -3.96, p = 0.000$, respectivamente). El grupo control con respecto al **grupo 3** (de inyección en el 9° día) no muestra diferencias ($t = 1.41, p = 0.15$ y $t = -0.47, p = 0.63$, respectivamente). Entre el grupo control y el **grupo 4** (inyección en el 10° día) no hubo

diferencias en el peso y talla ($t = -0.27$, $p = 0.78$ y $t = -0.67$, $p = 0.49$, respectivamente). Finalmente, en el **grupo 5** (de inyección en el día 12°) contra el control son diferentes solo en la talla, pero el peso no difiere estadísticamente ($t = -2.12$, $p = 0.035$ y $t = -1.09$, $p = 0.27$, respectivamente).

De acuerdo a la dosis administrada, entre el grupo control y la **dosis de 0.12 mg/kg** hubo diferencia en el peso, pero no en la talla ($t = 3.24$, $p = 0.001$ y $t = 1.26$, $p = 0.20$, respectivamente). A **dosis de 0.25 mg/kg** contra el grupo control, no se encontró diferencia significativa en el peso ni en la talla ($t = 0.93$, $p = 0.35$ y $t = -1.22$, $p = 0.22$, respectivamente). A **dosis de 0.5 mg/kg** vs grupo control, se encontró diferencia en el peso y talla ($t = 4.65$, $p = 0.000$ y $t = 2.90$, $p = 0.004$, respectivamente).

6.2.2.1.2. Pruebas de Asociación para peso y talla

No hubo correlación entre el peso y el grupo, pero el peso y la dosis administrada tuvieron correlación negativa (Pearson 0.21, $p = 0.00$). La talla y la dosis administrada también mostraron correlación negativa (Pearson -0.12 , $p = 0.024$), mientras que por grupo asignado no mostró diferencia.

6.2.2.1.3. ANOVA para peso y talla

Por grupo no hubo diferencias en el peso y talla del grupo control con los grupos experimentales. El grupo **control** es diferente en peso y talla con respecto al **grupo 2** (de inyección salina) ($p = 0.000$ y 0.005 , respectivamente). Por dosis se mostraron diferentes a las **dosis de 0.12 y 0.50 mg/kg** ($p = 0.032$ y 0.000 , respectivamente). La talla mostró diferencias entre el grupo control y el de dosis de 0.5 mg/kg ($p = 0.015$). Por grupo/dosis, el peso fetal del grupo control fue diferente con el grupo 2 (de inyección salina); a dosis de 0.5 mg/kg el grupo control fue diferente del grupo de inyección en el 9° día.

6.2.2.2. Alteraciones fetales externas

Del los 352 fetos vivos de todas las camadas, 81 fetos (23.0%) mostraron alteraciones externas y de éstos 11 presentaron malformaciones (3.1%) (Tabla 6, gráfico 5B). Las

alteraciones externas consistieron en retraso del crecimiento intrauterino (12.5%) [Fig. 13, 15, 16, 18, 19, 22-24 y 28], edema (6%) [Fig. 15, 22, 24 y 28], hipotrofia (8.2%) (calculada por dos desviaciones estándar por debajo de la media del grupo control en peso y talla) [Fig. 13, 15, 16, 18, 22-24 y 28], hematomas (0.6%) [Fig. 32 y 34] y diversas malformaciones (Tabla 7, gráfico 5B). De estas últimas se encontraron malformaciones de la cabeza (2.6%) [Fig. 13, 15, 16, 24 y 28], defectos del tubo neural (0.3%) [Fig. 18], de las extremidades (1.1%) [Fig. 15, 18, 19 y 28], de la cola (0.6%) y de la columna vertebral (0.6%) [Fig. 15, 28 y 32] (Tabla 7). Las alteraciones externas se presentaron tanto en forma aislada, como combinadas en un mismo feto y/o en fetos con edema, retraso de crecimiento o hipotrofia; 31 fetos tenían más de dos alteraciones externas y/o malformaciones.

Por grupo asignado se encontraron (Tablas 6 y 7): en el **grupo 1** (control) dos casos anormales (3.7%) (ambos con hipotrofia); en el **grupo 2** (de inyección salina) se detectó un caso anormal (2.1%) (con retraso del crecimiento y con hipotrofia); en el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) se encontraron 38 casos (43.7%) en el **grupo 4** (de inyección en el 10° día) existieron 21 casos (31.8%), y en el **grupo 5** (de inyección en el 12° día) hubo 19 fetos afectados (19.4%) (Gráfico 5B).

Por dosis administrada se observaron tres casos en los grupos 1 y 2 (dosis de 0.00mg/kg), correspondientes a hipotrofia; a dosis de **0.12 mg/kg** se obtuvieron 24 casos, a dosis de **0.25 mg/kg** se encontraron 31 casos, y a dosis de **0.5 mg/kg** se obtuvieron 23 casos.

6.2.2.2.1. Prueba de χ^2 para sexo y alteraciones externas

No hubo diferencias ni correlación en la frecuencia de sexo por grupo/dosis. La distribución por sexo fue similar en todos los grupos ($p = 0.76, 0.23$ y 0.31 para los grupos 3, 4 y 5 -de 9°, 10° y 12° día-).

Por dosis se encontraron diferencias en el número de alteraciones externas entre los grupos ($p = 0.000$), con una correlación positiva (Spearman $0.35, p = 0.003$). Por grupo asignado existió diferencia entre los grupos ($p = 0.000$), con una correlación positiva (Spearman $0.12, p = 0.024$). Por grupo/dosis las alteraciones externas fueron significativamente diferentes entre el **grupo control** y el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) ($p = 0.008$), pero

no con los **grupos 4 y 5** (de inyección en el 10° y 12° día) ($p = 0.086$). De igual forma sólo hubo correlación positiva de la dosis con la frecuencia de alteraciones externas en los **grupos 3 y 5** (inyección en el 9° y 12° día) (Spearman 0.31, $p = 0.003$ y Spearman 0.21, $p = 0.03$, respectivamente).

Cabe mencionar que dentro de las alteraciones externas la combinación de alteraciones externas y/o malformaciones simples o múltiples no describe el número total de todas las alteraciones externas, por lo que se muestran las frecuencias por separado. Las alteraciones externas por separado fueron las siguientes:

La **frecuencia de edema** fue diferente entre los grupos ($p = 0.007$) con una correlación positiva de acuerdo a la dosis (Spearman 0.14, $p = 0.005$), igualmente de acuerdo al grupo asignado ($p = 0.009$, Spearman 0.13, $p = 0.010$). De acuerdo al grupo/dosis sólo el grupo 3 (de inyección en el 9° día) mostró diferencia ($p = 0.03$) pero sin correlación al grupo y dosis.

La **frecuencia del retraso del crecimiento intrauterino** fue diferente entre los grupos ($p = 0.000$), con una correlación positiva a la dosis (Spearman 0.23, $p = 0.000$). De acuerdo al grupo asignado existió diferencias entre la frecuencia de los grupos ($p = 0.000$), pero no muestra correlación con el grupo asignado. Por dosis/grupo asignado presentaron diferencia de frecuencias en los grupos 4 y 5 (inyección al 10° y 12° día), pero no significativas ($p = 0.07$ y 0.08 , respectivamente) y sólo el grupo 5 (de inyección el día 12°) se correlacionó a la dosis/grupo (Spearman 0.22, $p = 0.027$).

La **hipotrofia** también mostró diferente frecuencia ($p = 0.001$) y una correlación positiva a la dosis (Spearman 0.19, $p = 0.000$). La frecuencia de acuerdo al grupo no presentó diferencias ni correlación ($p = 0.11$). El grupo 5 (inyección el 12° día), según la dosis/grupo asignado mostró diferencia significativa ($p = 0.025$) y en el grupo 4 (inyección el 10° día) la diferencia no fue significativa ($p = 0.07$) y ambos con correlación positiva al grupo/dosis (Spearman 0.26, $p = 0.007$ y Spearman 0.27, $p = 0.023$, respectivamente).

La frecuencia de **hematomas** no difieren significativamente entre los grupos ni tiene asociación a la dosis y/o grupo asignado ($p = 0.32$).

La frecuencia de **malformaciones** fue diferente entre los grupos ($p = 0.01$) y tuvo correlación positiva según la dosis (Spearman 0.15, $p = 0.004$). De acuerdo al grupo

asignado, hubo diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.031$) sin correlación. Todos los grupos sin diferencias ni correlación a la dosis/grupo.

Las **malformaciones de cabeza** tuvieron frecuencia diferente entre los grupos ($p = 0.32$) y una mínima relación positiva según la dosis (Spearman 0.12, $p = 0.019$). Igualmente difirió la frecuencia de acuerdo al grupo asignado ($p = 0.037$) pero sin correlación, sin diferencias o correlación a la dosis/grupo.

Los **defectos del tubo neural** no mostraron diferencias en la frecuencia entre los grupos, ni mostraron diferencia ni correlación según el grupo y/o dosis.

Las alteraciones en la **columna cervical** y de la **cola** no mostraron diferencias entre los grupos, ni asociación con la dosis y/o grupo asignado ($p = 0.32$).

Las alteraciones en las **extremidades** mostraron diferencia entre los grupos aunque no fue significativa ($p = 0.07$), pero si se correlacionaron con la dosis (Spearman 0.12, $p = 0.018$). No presentaron diferencia ni correlación de acuerdo al grupo asignado y/o dosis.

6.2.2.3. Alteraciones fetales internas

Se encontraron alteraciones internas en 86 fetos (24.4%) (Tabla 6, gráfico 5B), las cuales fueron: cardiopatía congénita (16.2%), líquido peritoneal (17.6%), líquido pleuropéricárdico (10.2%), hemopericardio (0.3%) [Figura 31], hipoplasia pulmonar (5.1%) [Figura 13, 17, 25 y 29], alteraciones en páncreas y bazo (2.8%) [Figura 14, 17, 20] y alteraciones genitourinarias como criptorquidia y riñón ectópico (2.3%) [Figura 16, 19, 25 y 31] (Tabla 8). De los fetos con alteraciones internas 47 presentan dos o más alteraciones internas.

De acuerdo al grupo asignado (Tablas 6 y 8, Gráfico 5B), no se encontraron alteraciones en los **grupos 1 y 2** (control y de inyección salina) y se observaron 30 casos en el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) (34.5%), 29 en el **grupo 4** (inyección en el 10° día) (43.9%) y 27 en el **grupo 5** (inyección en el 12° día) (27.6%).

Por dosis administrada (Tabla 6) no se observaron alteraciones internas en la dosis de 0.00 mg/kg (los grupos 1 y 2). A dosis de **0.12 mg/kg** se obtuvieron 35 casos (28.9%), a dosis de

0.25 mg/kg se encontraron 25 casos (34.7%), y a dosis de **0.5 mg/kg** se encontraron 26 casos (44.8%).

6.2.2.3.1. Prueba de χ^2 para alteraciones internas

La frecuencia por grupo y dosis de las alteraciones internas se muestra en la tabla 6. Los grupos se mostraron significativamente diferentes ($p = 0.000$) y se correlacionaron positivamente de acuerdo a la dosis (Spearman 0.36, $p = 0.000$). De igual forma, de acuerdo al grupo asignado las frecuencias fueron diferentes ($p = 0.000$) y de correlación positiva (Spearman 0.25, $p = 0.000$). Por grupo/dosis sólo el grupo 5 (inyección el día 12°) mostró diferencias significativa ($p = 0.000$) y correlación positiva (Spearman 0.45, $p = 0.000$). De la misma manera que en las alteraciones externas se describen las alteraciones internas por separado.

El **líquido peritoneal** de acuerdo a la dosis fue diferente en todos los grupos ($p = 0.000$) y de correlación positiva (Spearman 0.23, $p = 0.000$) y de igual forma por grupo asignado ($p = 0.000$ y Spearman 0.18, $p = 0.000$). Según la dosis y grupo fue significativamente diferente en los grupos experimentales (inyección el 9°, 10° y 12° día) ($p = 0.017$, 0.05, 0.001, respectivamente). El grupo 3 (inyección el día 9°) presentó correlación inversa (Spearman -0.24, $p = 0.021$) y el grupo 5 (inyección el día 12°) correlación positiva (Spearman 0.34, $p = 0.001$), mientras que el grupo 4 (inyección el día 10°) día no mostró correlación.

La frecuencia de **líquido pleuropericárdico** según la dosis fue diferente en todos los grupos ($p = 0.000$) y con correlación positiva (Spearman 0.23, $p = 0.000$). Por grupo asignado también fue diferente ($p = 0.001$) y relacionado (Spearman 0.20, $p = 0.000$). Fue diferente en los grupos 3 y 4 (de inyección en el 9° y 10° día) ($p = 0.002$ y 0.039, respectivamente), pero no tuvo correlación de acuerdo al grupo y la dosis.

El **hemopericardio** no presentó diferencias ni correlación según el grupo y/o la dosis.

La frecuencia de la **hipoplasia pulmonar** fue significativamente diferente de acuerdo a la dosis en todos los grupos ($p = 0.000$) y con correlación positiva (Spearman 0.24, $p = 0.000$). Según el grupo asignado, no mostró diferencias entre los grupos ($p = 0.09$), ni

correlación. Mostraron diferencia los grupos 4 y 5 (de inyección en el 10° y 12° día) ($p = 0.004$ y 0.010) de acuerdo a la dosis/grupo y presentaron correlación positiva (Spearman 0.29 , $p = 0.016$ y Spearman 0.28 , $p = 0.005$, respectivamente).

Las alteraciones de **vísceras abdominales** (páncreas y bazo) por dosis mostraron diferencias significativas ($p = 0.002$) y correlación positiva (Spearman 0.17 , $p = 0.001$). De acuerdo al grupo asignado no hubo diferencias ni correlación ($p = 0.34$). Por dosis/grupo tuvieron una frecuencia estadísticamente diferente en el grupo 5 (de inyección en el día 12°) ($p = 0.007$) con correlación positiva (Spearman 0.26 , $p = 0.008$).

Las alteraciones **genitourinarias** no presentaron diferencia significativa de acuerdo a la dosis ($p = 0.19$), pero si tuvieron una ligera relación positiva (Spearman 0.11 , $p = 0.040$). No hubo diferencia ni correlación según el grupo asignado ($p = 0.15$). Tampoco mostraron diferencias ni existió correlación de acuerdo a la dosis/grupo.

6.2.2.4. Cardiopatías congénitas

Se encontraron 57 fetos con cardiopatía (16.2%) (Tablas 6 y 9, gráfico 6A), la cual consistió en: comunicación interatrial en 48 (13.6%) [Fig. 14, 17, 21 y 31], comunicación interventricular en ocho (2.3%) [Fig. 17, 21 y 23], alteraciones de las grandes arterias en seis casos (1.7%) [anillo aórtico en dos (0.6%), coartación aórtica en dos (0.6%), arco aórtico derecho en uno (0.3%) y estenosis pulmonar en uno (0.3%)], alteraciones de vasos arteriales y/o venosos principales en cinco (1.4%) y tetralogía de Fallot en uno (0.3%) (Tabla 9, gráfico 6B). De los 57 casos con cardiopatías, la comunicación interatrial correspondió al 84.2%, la comunicación interventricular el (14%), alteraciones de las grandes arterias al 10.5% [anillo aórtico (3.5%) y coartación aórtica (3.5%)], alteraciones de vasos arteriales y/o venosos principales al 8.8%, y finalmente la tetralogía de Fallot al (1.8%).

Por grupo asignado (Tablas 6 y 9, gráfico 6A) no se observaron cardiopatías en el **grupo control**, se encontró uno en el **grupo de inyección salina** (2.1%), 13 en el **grupo 3** (de inyección en el 9° día) (14.9%), siete en el **grupo 4** (de inyección en el 10° día) (10.6%) y 36 en el **grupo 5** (de inyección en el 12° día) (36.7%). Por dosis administrada se observaron

un caso a dosis de 0.0 mg/kg (del grupo 2); a **dosis de 0.12 mg/kg** se obtuvieron 27 casos (22.3%), a **dosis de 0.25 mg/kg** se encontraron 14 casos (19.4%) y a **dosis de 0.5 mg/kg** se detectaron 15 casos (25.9%). Se muestra la frecuencia de alteraciones externas, internas y cardiopatías por grupo asignado/dosis en la Tabla 6.

Para determinar la presencia de comunicación interatrial se midió el diámetro del anillo del foramen oval y el tabique interatrial, obteniendo $\leq 60\%$ del tabique en los casos considerados como con comunicación interatrial. De igual manera se midió la aorta ascendente, la aorta descendente, y el segmento preductal y postductal, para determinar la presencia de coartación aórtica, considerándose como tal cuando el diámetro del istmo aórtico fue menor al 60% de la aorta ascendente (Hyett, 1995).

Analizando la cardiopatía con respecto a la dosis y día de administración se encontró que:

- 1) A **dosis de 0.12 mg/kg** administrada en el **día 9° día**, se presentó un caso con ausencia de la arteria subclavia izquierda (Figura 14) ,
- 2) A **dosis de 0.25 mg/kg** administrada en el **9° día**, se presentó un caso con comunicación interatrial y comunicación interventricular asociadas (Fig. 17),
- 3) A **dosis de 0.50 mg/kg** administrada en el **9° día**, se detectó un caso con anillo aórtico, comunicación interventricular y rama única de la arteria pulmonar que se bifurca por arriba de las venas pulmonares (Fig. 19 y 20),
- 4) A **dosis de 0.25 mg/kg** administrada en el **10° día**, un caso con tetralogía de Fallot, en el cual además surgían cuatro vasos del arco aórtico - ya que de ahí se originaba la subclavia derecha -, y se asociaba una comunicación interatrial (Fig. 26 y 27),
- 5) A **dosis de 0.50 mg/kg** administrada en el **10° día**, se observó un caso de cardiopatía compleja que mostraba comunicación interatrial, comunicación interventricular, aorta cabalgante, ausencia de la vena cardinal izquierda y arco aórtico derecho con conducto arterioso derecho (Fig. 29 y 30),
- 6) A **dosis de 0.25 mg/kg** administrada en el **12° día**, un caso con estenosis pulmonar (Fig. 33),
- 7) A **dosis de 0.50 mg/kg** administrada en el **12° día**, se encontró un caso de anillo aórtico y dos de coartación aórtica (Fig. 35).

6.2.2.4.1. Prueba de Chi² para cardiopatías congénitas

Las cardiopatías de acuerdo al grupo asignado fueron estadísticamente diferentes ($p = 0.000$) y con correlación positiva (Spearman 0.34, $p = 0.000$). Lo mismo sucedió dependiendo de la dosis ($p = 0.000$, Spearman 0.22, $p = 0.000$). De acuerdo a la dosis y grupo asignado existió diferencia en los grupos experimentales 3, 4 y 5 (inyección el 9°, 10° y 12° día) ($p = 0.46$, 0.023 y 0.001, respectivamente) y con una correlación positiva significativa en los grupos 3 y 4 (de inyección en el 9° y 10° día) (Spearman 0.22, $p = 0.037$ y Spearman 0.29, $p = 0.016$, respectivamente), y con correlación negativa significativa en el grupo 5 (de inyección el día 12°) (Spearman -0.31, $p = 0.001$).

La **comunicación interatrial** según el grupo asignado o dosis presentó diferencia significativa ($p = 0.000$) y una pequeña correlación positiva (Spearman 0.35, $p = 0.000$ y Spearman 0.16, $p = 0.002$, respectivamente). Por grupo asignado/dosis los grupos 4 y 5 (días 10° y 12° de inyección) presentaron diferencias significativas ($p = 0.015$ y 0.000, respectivamente) y el grupo 4 presentó además correlación positiva (Spearman 0.33, $p = 0.005$), mientras que en el grupo 5 la correlación fue negativa (Spearman -0.35, $p = 0.000$).

La **comunicación interventricular** de acuerdo al grupo asignado o dosis presentó diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.028$ y 0.003), pero sin correlación con el grupo y con correlación positiva de acuerdo a la dosis (Spearman 0.17, $p = 0.001$). Según el grupo/dosis, sólo el grupo 3 (inyección en el día 9°) presentó diferencia significativa ($p = 0.003$) y correlación positiva (Spearman 0.32, $p = 0.002$).

La **tetralogía de Fallot** no mostró diferencias según en grupo asignado y/o la dosis ($p = 0.36$ y 0.27, respectivamente), ni asociación.

Las alteraciones **de venas y arterias** de acuerdo al grupo asignado y/o dosis no presentaron diferencias significativas ($p = 0.51$ y 0.22, respectivamente), ni correlación en el grupo asignado y grupo/dosis, pero si hubo una pequeña correlación con la dosis (Spearman 0.10, $p = 0.041$).

Las alteraciones de la **aorta** de acuerdo al grupo asignado no presentaron diferencias significativas ($p = 0.49$) ni correlación. Pero de acuerdo a la dosis, si hubo diferencias significativas ($p = 0.000$) y una ligera correlación positiva (Spearman 0.18, $p = 0.001$).

Según el grupo/dosis hubo diferencia significativa en el grupo 5 (inyección el 12° día) ($p = 0.025$) y no significativa en el grupo 4 (inyección el 10° día) ($p = 0.079$), con correlación positiva solo en el grupo 5 (Spearman 0.23, $p = 0.023$).

El **anillo aórtico** y la **coartación aórtica** según el grupo asignado no presentaron diferencias significativas ($p = 0.76$ y 0.26 , respectivamente) ni correlación. Según la dosis, el anillo aórtico y la coartación presentaron por igual diferencias significativa entre los grupos ($p = 0.017$) y una pequeña correlación positiva (Spearman 0.11, $p = 0.033$). Por grupo/dosis no hubo diferencias entre los grupos ($p = 0.14$ y 0.088 , respectivamente), ni tampoco correlación.

Las **cardiopatías** tuvieron una ligera correlación negativa con el **peso fetal** (Spearman -0.15 , $p = 0.003$) y la talla (Spearman -0.15 , $p = 0.005$). No tuvo relación con el sexo.

Existió una pequeña correlación positiva de las **cardiopatías** con las **alteraciones externas** (Spearman 0.14, $p = 0.007$), **edema** (Spearman 0.11, $p = 0.028$), **retraso del crecimiento intrauterino** (Spearman 0.13, $p = 0.01$), **hipotrofia** (Spearman 0.17, $p = 0.001$), y con las **malformaciones en conjunto** (Spearman 0.22, $p = 0.000$). De las malformaciones por entidad se correlacionó positivamente con las **malformaciones de la cabeza** (Spearman 0.17, $p = 0.001$), el **defecto del tubo neural** (Spearman 0.12, $p = 0.023$) y con las **malformaciones de extremidades** (Spearman 0.17, $p = 0.001$). No hubo correlación de las cardiopatías con los hematomas, alteraciones vertebrales, ni las malformaciones de la cola.

Existió una pequeña correlación positiva con las **alteraciones internas** (Spearman 0.12, $p = 0.017$). La correlación de las cardiopatías fue positiva con la **hipoplasia pulmonar** (Spearman 0.24, $p = 0.000$), **hemopericardio** (Spearman 0.12, $p = 0.023$), otras alteraciones internas (Spearman 0.11, $p = 0.028$), alteraciones en **páncreas y bazo** (Spearman 0.15, $p = 0.003$). No tuvo correlación con la presencia de líquido peritoneal, líquido pleuropericardico, ni alteraciones genitourinarias.

Las **alteraciones aórticas** se asociaron con la presencia de **alteraciones en otros vasos** (venas y/o arterias) (Spearman 0.39, $p = 0.000$), con la **comunicación interventricular** (Spearman 0.30, $p = 0.000$) y tuvo una pequeña correlación con la **comunicación interatrial** (Spearman 0.16, $p = 0.002$). La **comunicación interventricular** se asoció con **alteraciones en otros vasos** (arterias y/o venas) (Spearman 0.30, $p = 0.000$).

6.3. TABLAS

Tabla 1. Número de camadas, incremento de peso materno durante la gestación y número de casos con alteraciones maternas encontradas durante la cesárea por grupo experimental y dosis recibida de metotrexate

Grupo	Dosis mg/kg	No. camadas	Incremento peso materno (g)	No. Casos de alteraciones maternas
1: Control	0.00	5	M = 118.040 DE = 13.645	1
2. Inyección Salina	0.00	5	M = 101.540 DE = 29.433	0
3: Inyección 9º día	0.12	5	M = 91.200 DE = 12.692	1
	0.25	5	M = 56.760 DE = 11.284	1
	0.50	5	M = 51.440 DE = 23.060	3
	Subtotal	15	M = 66.466 DE = 23.814	5
4. Inyección 10º día	0.12	5	M = 89.100 DE = 32.172	1
	0.25	5	M = 53.040 DE = 18.814	1
	0.50	5	M = 46.700 DE = 34.831	1
	Subtotal	15	M = 62.946 DE = 33.423	3
5. Inyección 12º día	0.12	5	M = 88.280 DE = 38.025	1
	0.25	5	M = 82.860 DE = 29.872	0
	0.50	5	M = 70.020 DE = 31.093	1
	Subtotal	15	M = 80.386 DE = 31.735	2
TOTAL		55	M = 77.180 DE = 32.806	11

M= media DE= desviación estándar.

Tabla 2. Número de casos y promedio por grupo asignado y dosis administrada de metotrexate para la muestra obtenida

Grupo	Dosis mg/kg	No de camadas	No de fetos vivos	No de fetos muertos	Reabsorciones	No de fetos vivos normales	No de fetos vivos anormales
1: Control	0.00	5	54 M= 10.80 DE= 2.588	0 M= 0 DE= 0	9 M= 1.80 DE= 1.304	52 M= 10.40 DE= 2.510	2 M= 0.40 DE= 0.89
2: Inyección Salina	0.00	5	47 M= 9.40 DE= 3.435	2 M= 0.40 DE= 0.894	4 M= 0.80 DE= 1.304	46 M= 9.20 DE= 3.701	1 M= 0.20 DE= 0.447
3: Inyección 9º día	0.12	5	44 M= 8.80 DE= 1.924	1 M= 0.20 DE= 0.447	9 M= 1.80 DE= 0.837	32 M= 6.40 DE= 4.159	12 M= 2.40 DE= 3.362
	0.25	5	25 M= 5.00 DE= 3.240	5 M= 1.00 DE= 1.000	21 M= 4.20 DE= 2.490	10 M= 2.00 DE= 3.464	15 M= 3.00 DE= 2.550
	0.50	5	18 M= 3.60 DE= 2.881	8 M= 1.60 DE= 2.191	34 M= 6.80 DE= 3.768	7 M= 1.40 DE= 1.140	11 M= 2.20 DE= 2.490
	Subtotal	15	87 M= 5.80 DE= 3.406	14 M= 0.93 DE= 1.438	64 M= 4.27 DE= 3.240	49 M= 3.27 DE= 3.751	38 M= 2.53 DE= 2.642
4. Inyección 10º día	0.12	5	40 M= 8.00 DE= 3.317	3 M= 0.60 DE= 0.894	9 M= 1.80 DE= 2.168	31 M= 6.20 DE= 4.207	9 M= 1.80 DE= 1.789
	0.25	5	15 M= 3.00 DE= 2.828	3 M= 0.60 DE= 1.342	36 M= 7.20 DE= 3.564	7 M= 1.40 DE= 2.191	8 M= 1.60 DE= 2.074
	0.50	5	11 M= 2.20 DE= 3.899	0 M= 0.00 DE= 0.000	38 M= 7.60 DE= 4.393	7 M= 1.40 DE= 3.130	4 M= 0.60 DE= 0.894
	Subtotal	15	66 M=4.40 DE= 4.102	6 M=0.40 DE= 0.910	83 M=5.53 DE= 4.240	45 M=3.00 DE= 3.836	21 M=1.33 DE= 1.633
5. Inyección 12º día	0.12	5	37 M= 7.40 DE= 2.966	0 M= 0.00 DE= 0.000	16 M= 3.20 DE= 0.837	34 M= 6.80 DE= 1.924	3 M= 0.60 DE= 1.342
	0.25	5	32 M= 6.40 DE= 3.715	0 M= 0.00 DE= 0.000	12 M= 2.40 DE= 1.817	24 M= 4.80 DE= 4.764	8 M= 1.60 DE= 1.342
	0.50	5	29 M= 5.80 DE= 4.494	1 M= 0.20 DE= 0.447	19 M= 3.80 DE= 2.950	21 M= 4.20 DE= 4.025	8 M= 1.60 DE= 2.074
	Subtotal	15	98 M= 6.53 DE= 3.563	1 M= 0.07 DE= 0.258	47 M= 3.13 DE= 1.995	79 M= 5.27 DE= 3.674	19 M= 1.27 DE= 1.580
Subtotal	0.00	10	101	2	13	98	3
Subtotal	0.12	15	121	4	34	97	24
Subtotal	0.25	15	72	8	69	41	31
Subtotal	0.50	15	58	9	91	35	23
TOTAL		55	352	23	207	271	81

M= media DE= desviación estándar.

Tabla 3: Número de casos y porcentaje por grupo y dosis administrada para sexo fetal

Grupo	Dosis mg/kg	Total fetos	Sexo Femenino	Sexo Masculino
1: Control	0.00	54	26 (48.1%)	28 (51.9%)
2: Inyección salina	0.00	47	19 (40.4%)	28 (59.6%)
3: Inyección 9º día	0.12	44	21 (47.7%)	23 (52.3%)
	0.25	25	10 (40.0%)	15 (60.0%)
	0.50	18	9 (50%)	9 (50%)
	Subtotal	87	40 (46.0%)	47 (54.0%)
4: Inyección 10º día	0.12	40	26 (65.0%)	14 (35.0%)
	0.25	15	9 (60.0%)	6 (40.0%)
	0.50	11	4 (36.4%)	7 (63.6%)
	Subtotal	66	39 (59.1%)	27 (40.9%)
5: Inyección 12º día	0.12	37	18 (48.6%)	19 (51.4%)
	0.25	32	10 (31.3%)	22 (68.7%)
	0.50	29	13 (44.8%)	16 (55.2%)
	Subtotal	98	41 (41.8%)	57 (58.2%)
Total		352	165 (46.9%)	187 (53.1%)

Tabla 4. Correlación Eta para dosis/grupo

	Eta	Sig.
peso total ganado * Grupo asignado *dosis	0.528	0.002
Fetos vivos * Grupo asignado *dosis	0.492	0.007
Fetos muertos * Grupo asignado *dosis	0.362	0.129
Reabsorciones * Grupo asignado *dosis	0.452	0.020
No de fetos normales * Grupo asignado *dosis	0.592	0.000
No de fetos anormales * Grupo asignado *dosis	0.420	0.042
Alteraciones maternas * Grupo asignado *dosis	0.246	0.527

Tabla 5: Pesos y talla promedio de los fetos por grupo asignado y dosis administrada de metotrexate

Grupo	Dosis mg/kg	Peso (g)	Longitud (cm)
1: Control	0.00	M= 3.678 DE= 0.544	M= 3.322 DE= 0.194
2: Inyección Salina	0.00	M= 4.345 DE= 0.779	M= 3.494 DE= 0.242
3: Inyección 9° día	0.12	M= 3.500 DE= 0.587	M= 3.3145 DE= 0.234
	0.25	M= 3.938 DE= 1.035	M= 3.481 DE= 0.263
	0.50	M= 2.902 DE= 0.464	M= 3.211 DE= 0.200
	Subtotal	M= 3.502 DE= 0.803	M= 3.341 DE= 0.253
4: Inyección 10° día	0.12	M= 3.816 DE= 0.592	M= 3.372 DE= 0.176
	0.25	M= 3.444 DE= 0.857	M= 3.362 DE= 0.294
	0.50	M= 3.699 DE= 1.136	M= 3.250 DE= 0.372
	Subtotal	M= 3.712 DE= 0.768	M= 3.350 DE= 0.246
5: Inyección 12° día	0.12	M= 3.826 DE= 0.439	M= 3.419 DE= 0.137
	0.25	M= 4.006 DE= 1.015	M= 3.470 DE= 0.338
	0.50	M= 3.572 DE= 0.812	M= 3.333 DE= 0.305
	Subtotal	M= 3.810 DE= 0.788	M= 3.410 DE= 0.271
Total		M= 3.767 DE= 0.792	M= 3.379 DE= 0.252

M= media DE= desviación estándar.

Tabla 6: Número y porcentaje de fetos con alteraciones externas, malformaciones, alteraciones internas y cardiopatías congénitas por grupo y dosis administrada

Grupo	Dosis mg/kg	Total fetos	Con alteraciones externas	Malformaciones	Con alteraciones internas	Con cardiopatía congénita
1: Control	0.00	54	2 (3.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2: Inyección salina	0.00	47	1 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.1%)
3: Inyección 9° día	0.12	44	12 (27.3%)	2 (2.3%)	16 (36.4%)	4 (9.1%)
	0.25	25	15 (60.0%)	3 (3.4%)	11 (44.0%)	3 (12.0%)
	0.50	18	11 (61.1%)	2 (2.3%)	3 (16.7%)	6 (33.3%)
	Subtotal	87	38 (43.7%)	7 (8.0%)	30 (34.5%)	13 (14.9%)
4: Inyección 10° día	0.12	40	9 (22.5%)	0 (0%)	17 (42.5%)	1 (2.5%)
	0.25	15	8 (53.3%)	1 (1.5%)	5 (33.3%)	4 (26.7%)
	0.50	11	4 (36.4%)	1 (1.5%)	7 (63.6%)	2 (18.2%)
	Subtotal	66	21 (31.8%)	2 (2.3%)	29 (43.9%)	7 (10.6%)
5: Inyección 12° día	0.12	37	3 (8.1%)	0 (0%)	2 (5.4%)	22 (59.5%)
	0.25	32	8 (25.0%)	2 (2.3%)	9 (28.1%)	7 (21.9%)
	0.50	29	8 (27.6%)	0 (0%)	16 (55.2%)	7 (24.1%)
	Subtotal	98	19 (19.4%)	2 (2.3%)	27 (27.6%)	36 (36.7%)
Total		352	81 (23.0%)	11 (3.1%)	86 (24.4%)	57 (16.2%)

Tabla 7: Número de casos y porcentaje por grupo y dosis administrada de las diversas alteraciones externas fetales

Grupo	Dosis mg/kg	Tipo de alteraciones externas								
		Edema	RCI	Hipo-trofia	Alt. cabeza	DTN	Alt. musc. y verte-brales	Alt. extremi-dades	Alt. caudales	Hema-tomas
1: Control	0.00			2 (3.7%)						
2: Inyección Salina	0.00		1 (2.1%)	1 (2.1%)						
3: Inyección 9° día	0.12	1 (2.3%)	10 (22.7%)	5 (11.4%)	2 (4.5%)					
	0.25	4 (16.0%)	5 (20.0%)	2 (8.0%)	3 (12.0%)			1 (4.0%)	1 (4.0%)	
	0.50		8 (44.4%)	4 (22.2%)	1 (5.5%)	1 (5.5%)		1 (5.5%)		
	Subtotal	5 (5.8%)	23 (26.4%)	11 (12.6%)	6 (6.9%)	1 (1.2%)		2 (2.4%)	1 (1.2%)	
4: Inyección 10° día	0.12	4 (10.0%)	6 (15.0%)	2 (5.0%)						
	0.25	2 (13.3%)	6 (40.0%)	3 (20.0%)	1 (6.7%)			1 (6.7%)		
	0.50	3 (27.3%)	1 (9.1%)	3 (27.3%)	1 (9.1%)		1 (9.1%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)	
	Subtotal	9 (13.6%)	13 (19.7%)	8 (12.1%)	2 (3.0%)		1 (1.5%)	2 (3.0%)	1 (1.5%)	
5: Inyección 12° día	0.12	3 (8.1%)								
	0.25	3 (9.4%)	3 (9.4%)	2 (6.3%)	1 (3.1%)		1 (3.1%)			1 (3.1%)
	0.50	1 (3.5%)	4 (13.8%)	5 (17.2%)						1 (3.5%)
	Subtotal	7 (7.1%)	7 (7.1%)	7 (7.1%)	1 (1.0%)		1 (1.0%)			2 (2.0%)
Total		21 (6.0%)	44 (12.5%)	29 (8.2%)	9 (2.6%)	1 (0.3%)	2 (0.6%)	4 (1.1%)	2 (0.6%)	2 (0.6%)

Tabla 8: Número de casos y porcentaje por grupo y dosis para alteraciones internas diferentes a las cardiopatías congénitas

Grupo	Dosis mg/kg	Tipo de alteración interna					
		Líquido peritoneal	Líquido pleuropericardico	Hemopericardio	Pulmones hipoplásicos	Anomalías vísceras abdominales	Anomalías genito-urinarias
1: Control	0.00						
2: Inyección Salina	0.00						
3: Inyección 9° día	0.12	15 (34.1%)	3 (6.8%)		2 (4.5%)	2 (4.5%)	1 (2.3%)
	0.25	8 (32.0%)	8 (32.0%)		2 (8.0%)	1 (4.0%)	
	0.50				3 (16.7%)	1 (5.5%)	1 (5.5%)
	Subtotal	23 (26.4%)	11 (12.6%)		7 (8.1%)	4 (4.6%)	2 (2.3%)
4: Inyección 10° día	0.12	15 (37.5%)	6 (15.0%)				2 (5.0%)
	0.25	1 (6.7%)			4 (26.7%)	1 (6.7%)	2 (13.3%)
	0.50	5 (45.5%)	2 (18.2%)		1 (9.1%)	1 (9.1%)	
	Subtotal	21 (31.8%)	8 (12.1%)		5 (7.6%)	2 (3.0%)	4 (6.1%)
5: Inyección 12° día	0.12		2 (5.4%)	1 (2.7%)			
	0.25	9 (28.1%)	9 (28.1%)		1 (3.1%)		
	0.50	9 (31.0%)	6 (20.7%)		5 (17.2%)	4 (13.8%)	2 (6.9%)
	Subtotal	18 (18.4%)	17 (17.3%)	1 (1.0%)	6 (6.1%)	4 (4.1%)	2 (2.0%)
Total		62 (17.6%)	36 (10.2%)	1 (0.3%)	18 (5.1%)	10 (2.8%)	8 (2.3%)

Tabla 9: Número de casos y porcentaje por grupo y dosis para los tipos de cardiopatía congénita

Grupo	Dosis mg/kg	Tipo de cardiopatía							
		C.I.A.	C.I.V.	T. Fallot	Anorm vasos	Anillo aórtico	CoAo	Otras alt. aórticas	Esten. pulmonar
1: Control	0.00								
2: Inyección Salina	0.00	1 (2.1%)							
3: Inyección 9º día	0.12	3 (6.8%)			1 (2.3%)				
	0.25	3 (12.0%)	1 (4.0%)						
	0.50	2 (11.1%)	4 (22.2%)		1 (5.6%)	1 (5.6%)			
	Subtotal	8 (9.2%)	5 (5.7%)		2 (2.3%)	1 (1.2%)			
4: Inyección 10º día	0.12		1 (2.5%)						
	0.25	3 (20.0%)	1 (6.7%)	1 (6.7%)	1 (6.7%)				
	0.50	2 (18.2%)	1 (9.1%)		1 (9.1%)			1 (9.1%)	
	Subtotal	5 (7.6%)	3 (4.5%)	1 (1.5%)	2 (3.0%)			1 (1.5%)	
5: Inyección 12º día	0.12	22 (59.5%)							
	0.25	6 (18.8%)			1 (3.1%)				1 (3.1%)
	0.50	6 (20.7%)				1 (3.5%)	2 (6.9%)		
	Subtotal	34 (34.7%)			1 (1.0%)	1 (1.0%)	2 (2.0%)		1 (1.0%)
Total		48 (13.6%)	8 (2.3%)	1 (0.3%)	5 (1.4%)	2 (0.6%)	2 (0.6%)	1 (0.3%)	1 (0.3%)

6.4. GRÁFICAS

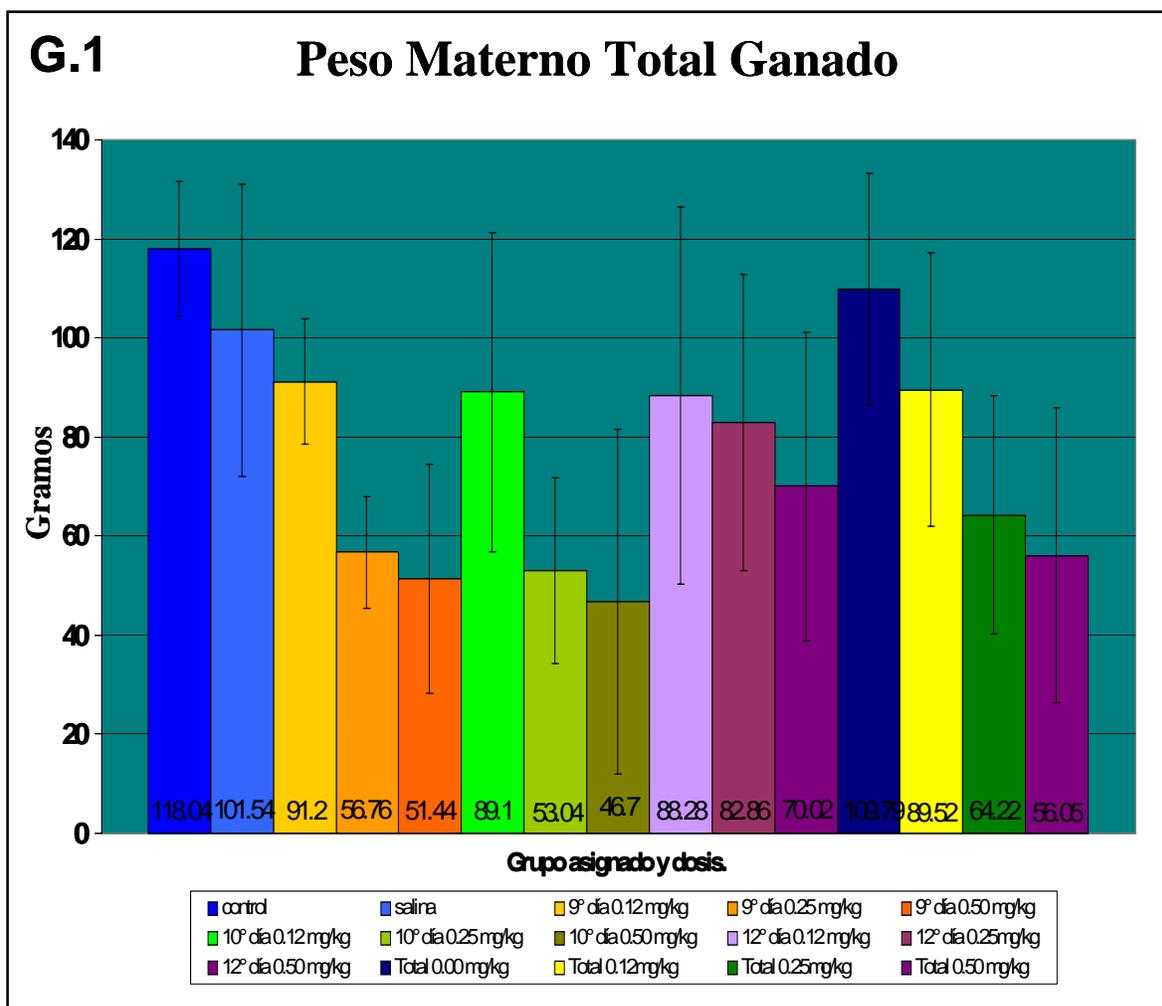


Gráfico 1. Promedio de peso ganado de las ratas gestantes en cada uno de los grupos asignados y dosis aplicada de MTX.

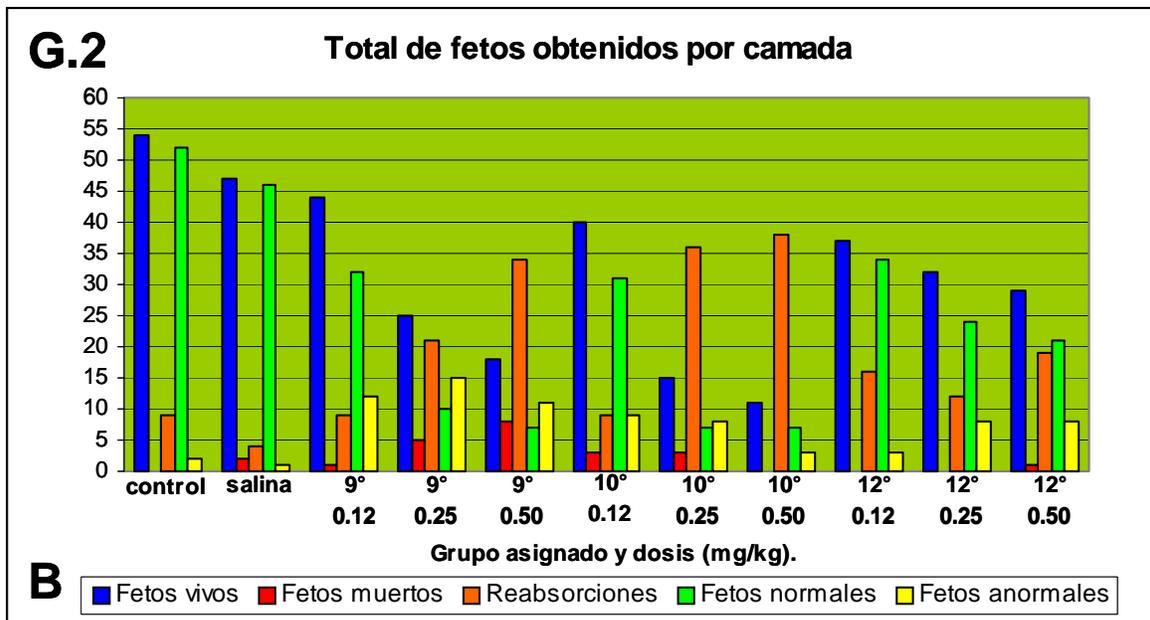
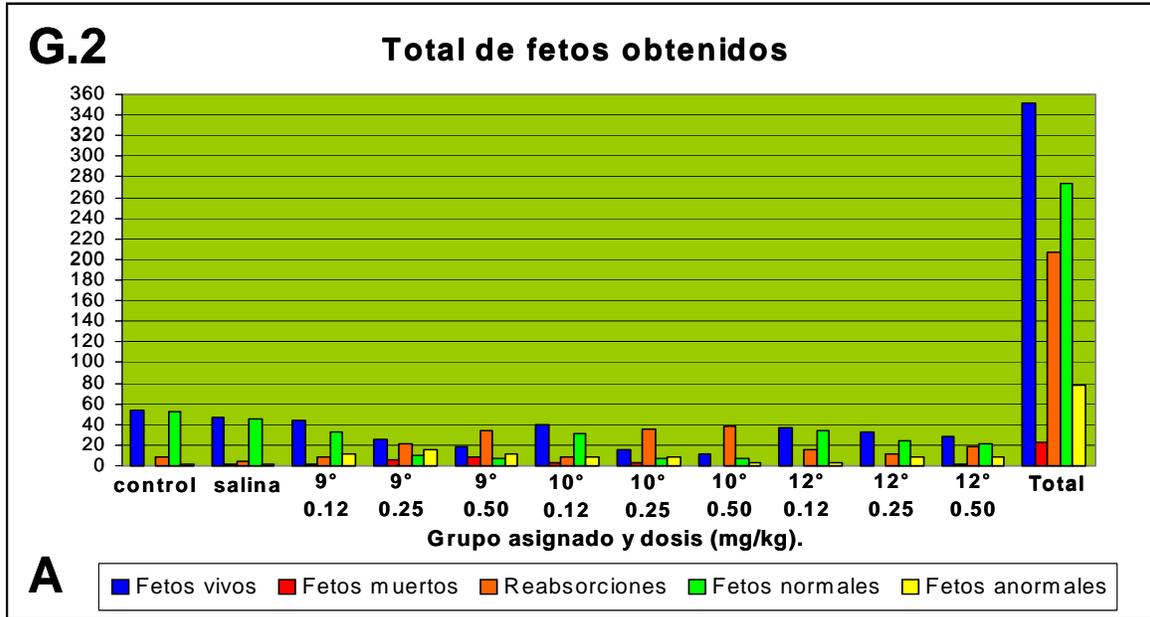


Gráfico 2. Número total de la muestra obtenida. **A.** Se observa el número de fetos vivos, vivos normales y anormales, fetos muertos y reabsorciones por grupo y dosis y el total final. **B.** Se muestra una ampliación de la muestra obtenida por grupo y dosis.

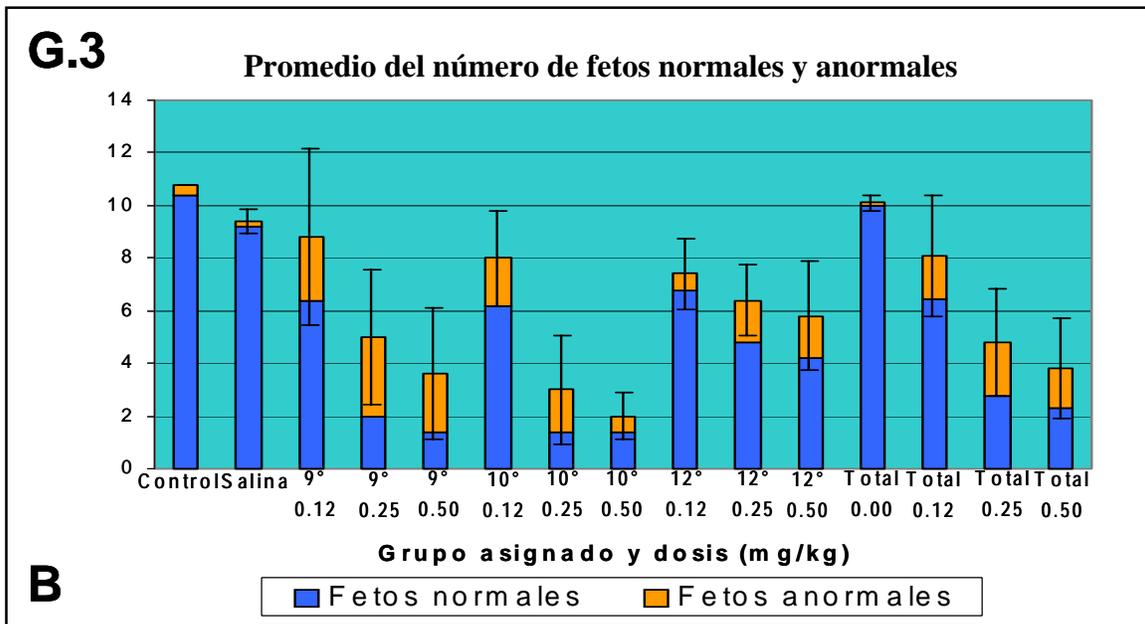
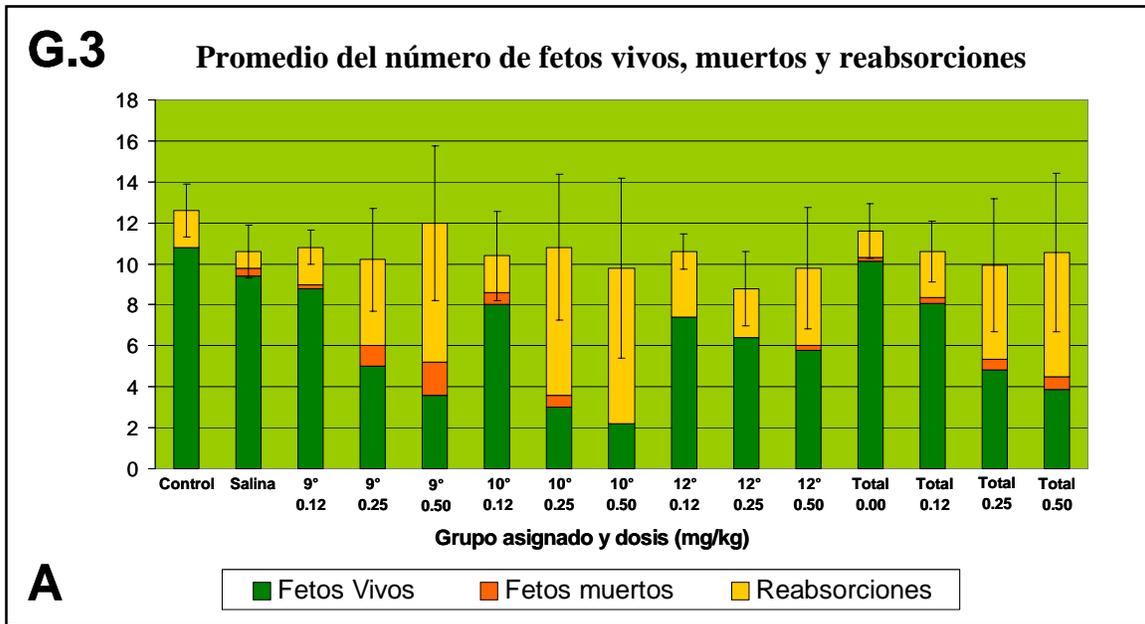


Gráfico 3. Promedios por grupo y dosis administrada de la muestra obtenida. **A.** Representa el promedio de fetos vivos, fetos muertos y reabsorciones obtenidos por camada en cada grupo y dosis aplicada. **B.** Del total de fetos vivos se muestra el promedio de fetos vivos normales y anormales por camada.

G.4

Promedio del número de fetos obtenidos

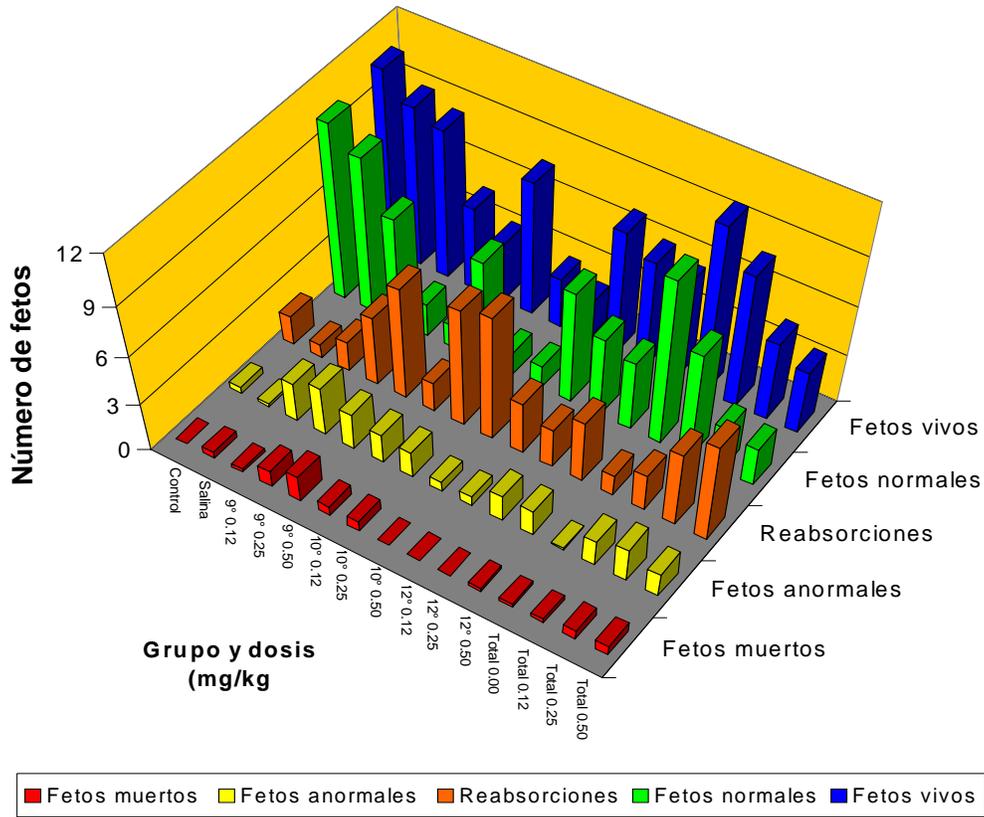


Gráfico 4. Promedio de fetos vivos, vivos normales y anormales, fetos muertos y reabsorciones por grupo y dosis administrada. El gráfico compara y muestra la relación inversa entre los fetos vivos y vivos normales contra los fetos anormales, muertos y reabsorciones en los diferentes grupos y dosis.

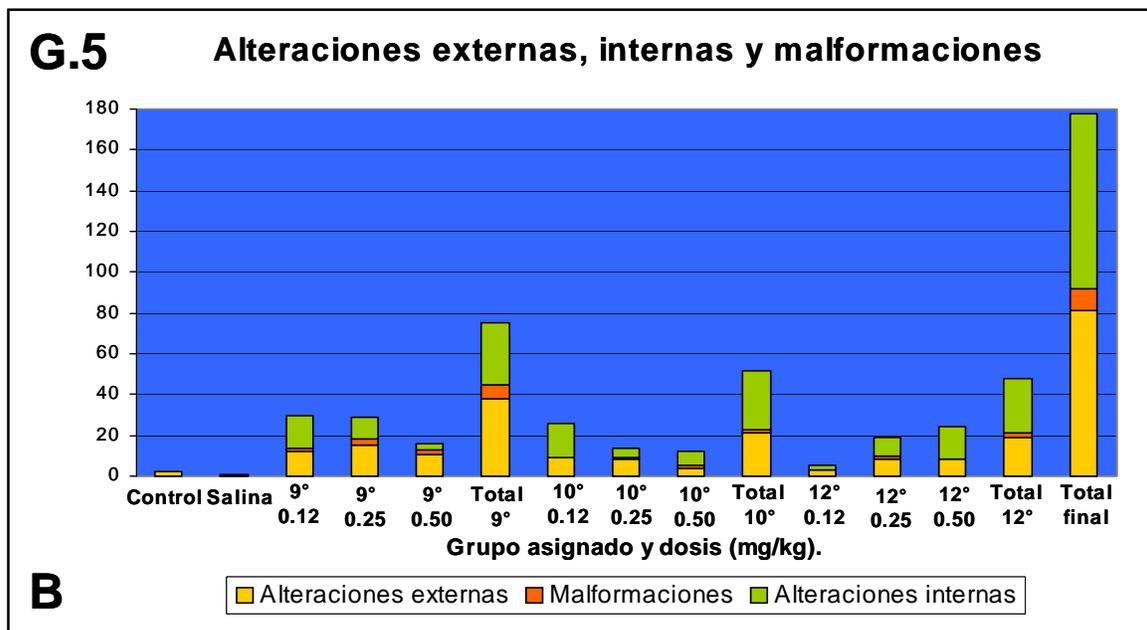
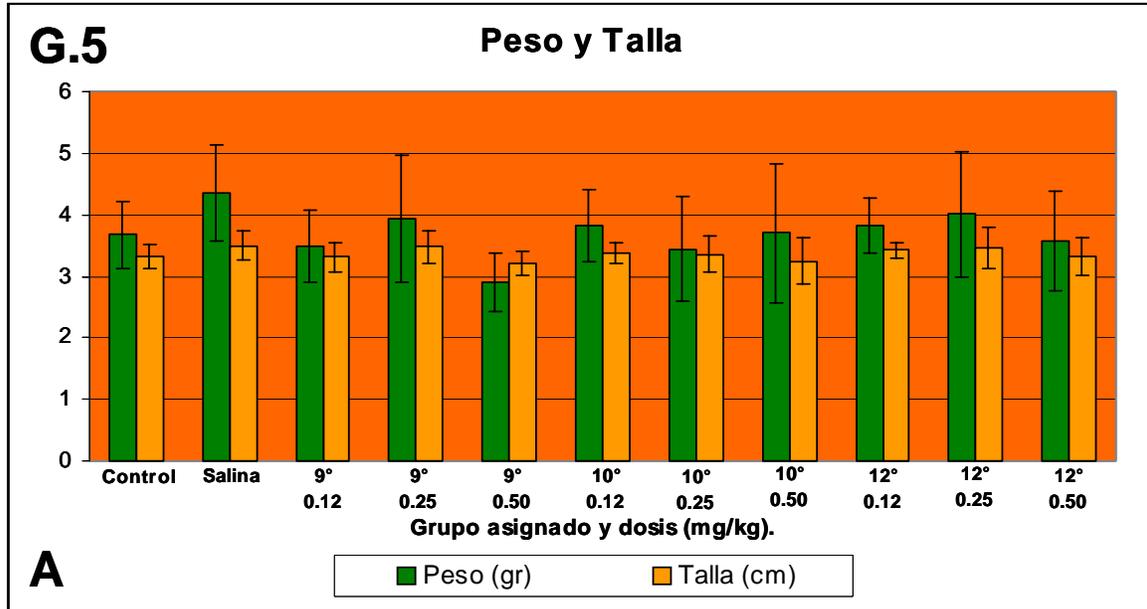


Gráfico 5. Características estudiadas en los fetos vivos obtenidos. **A.** Se presenta el promedio de peso y talla obtenido por feto de acuerdo al grupo asignado y dosis expuesta. **B.** Se muestra el número total de alteraciones externas, internas y malformaciones en los fetos vivos obtenidos de cada grupo y dosis administrada y el total final de estas alteraciones.

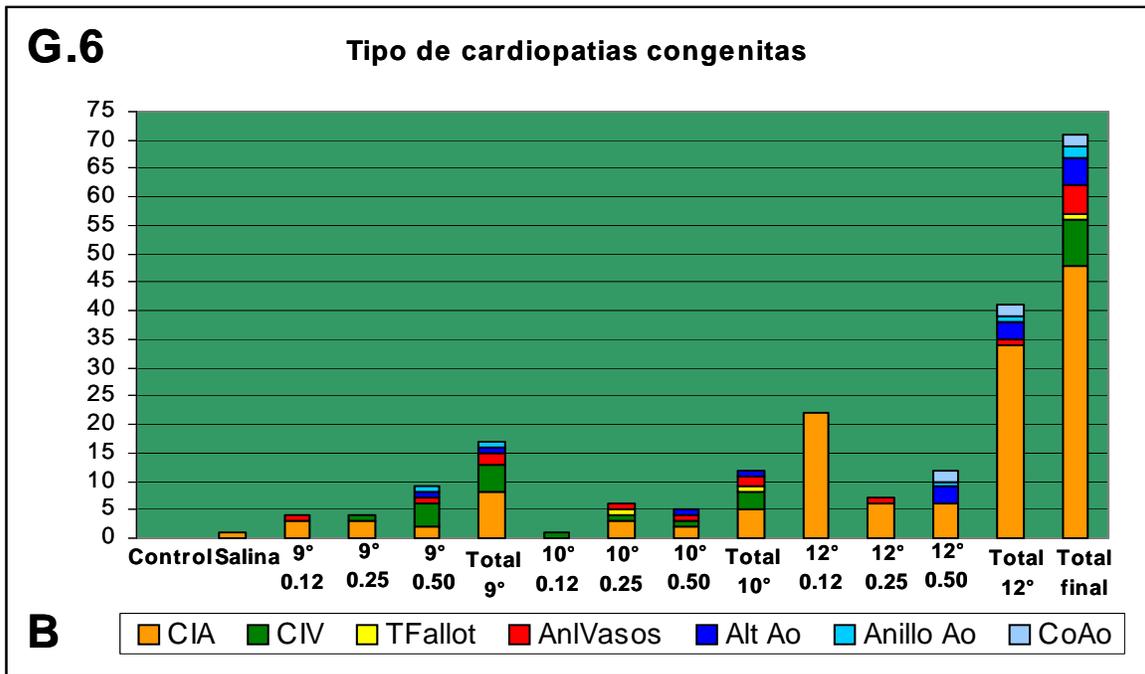
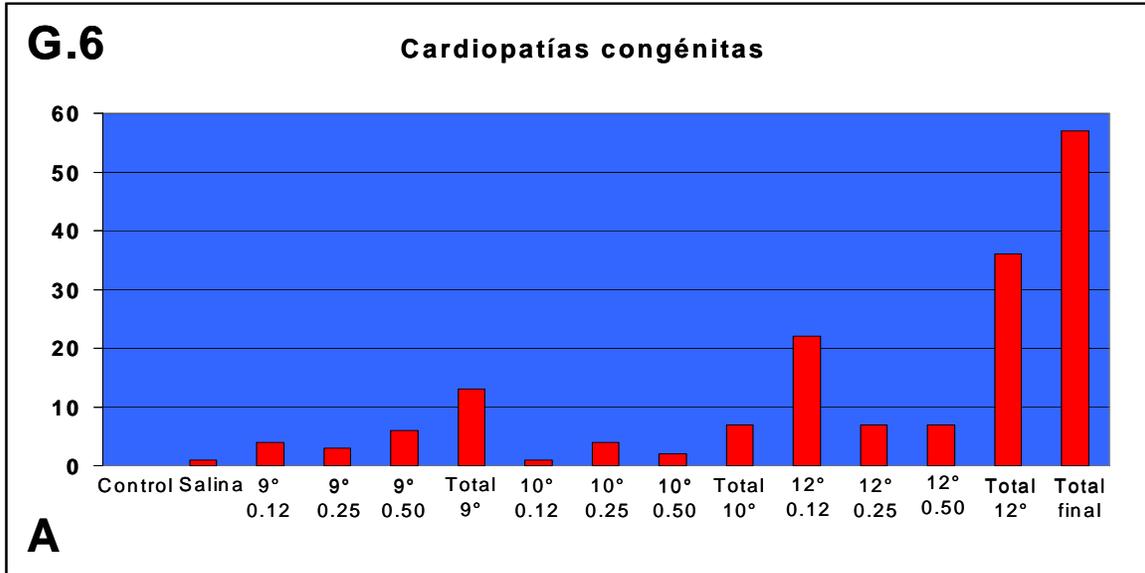


Gráfico 6. Cardiopatías congénitas. **A.** Muestra el número total de cardiopatías congénitas observadas en los fetos vivos obtenidos de cada grupo y dosis aplicada y el total de cardiopatías obtenidas. **B.** Muestra el tipo de cardiopatías congénitas presentes en los fetos y el número de casos de cada cardiopatía en los diferentes grupos y dosis administrada y el total final.

6.5. FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

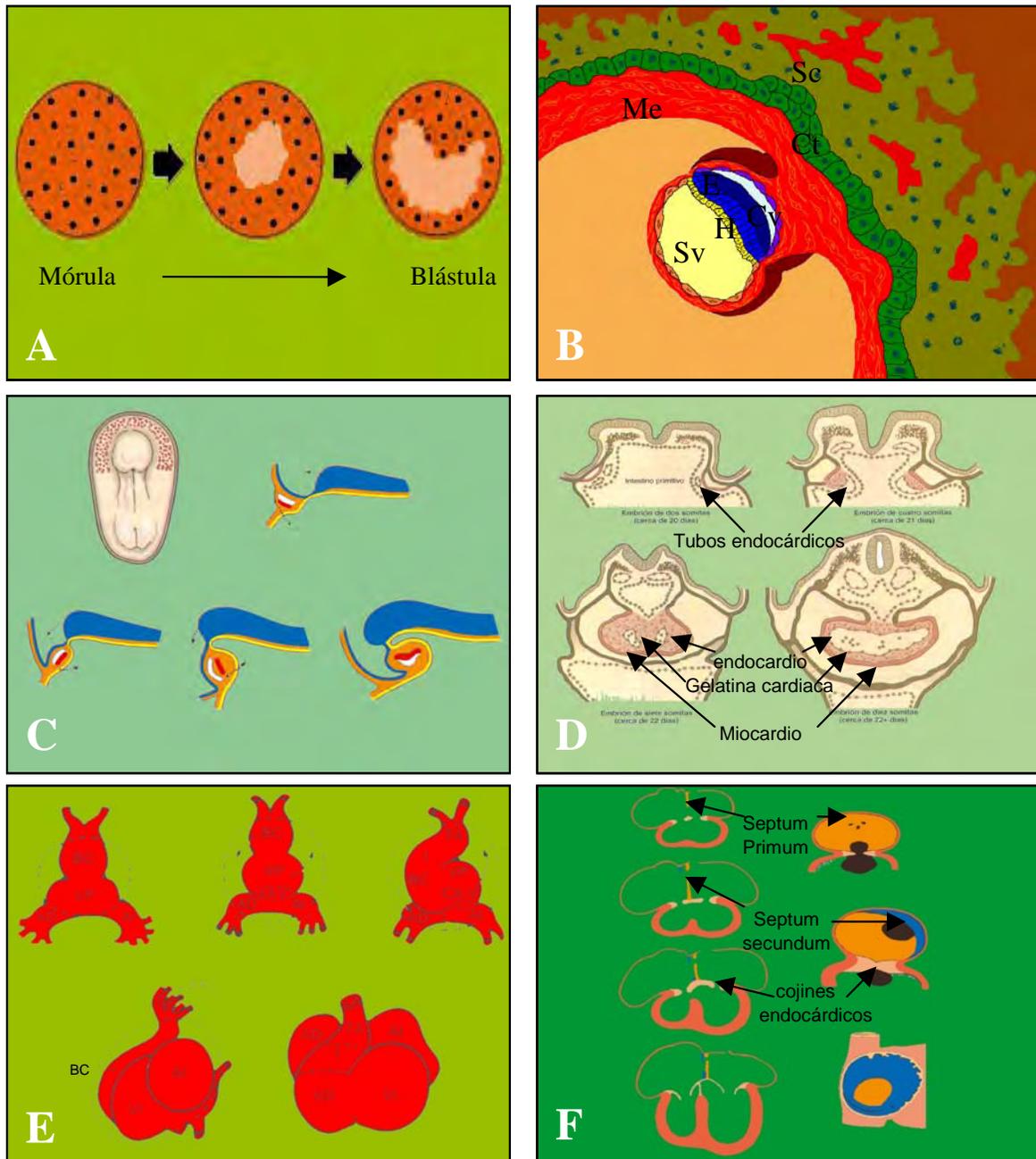


Fig. 1. Figuras del desarrollo normal del embrión y del corazón. **A.** Segmentación del cigoto (1º semana). **B.** Embrión bilaminar. E: epiblasto, H: hipoblasto, Sv: saco vitelino Cv: cavidad amniótica, Me: mesénquima extraembrionario, Ct: citotrofoblasto, Sc: Sinciotrofoblasto. **C.** Área cardíogena, formación del corazón en el mesodermo esplácnico y giro de 180°. **D.** Fusión de los tubos cardíacos y formación del endocardio y miocardio. **E.** Formación del asa cardíaca. AD-AI: atrio derecho e izquierdo VP: ventrículo primitivo BC: bulbus cordis, TA: tronco arterioso, CAV: canal atrio-ventricular, VD-VI: ventrículo derecho e izquierdo, AAo: arcos aórticos. **F.** Tabicación cardíaca auricular, atrioventricular y ventricular. Tomadas de Attie F, 1985; Sadler TW, 2004; Carlson BM, 2005.

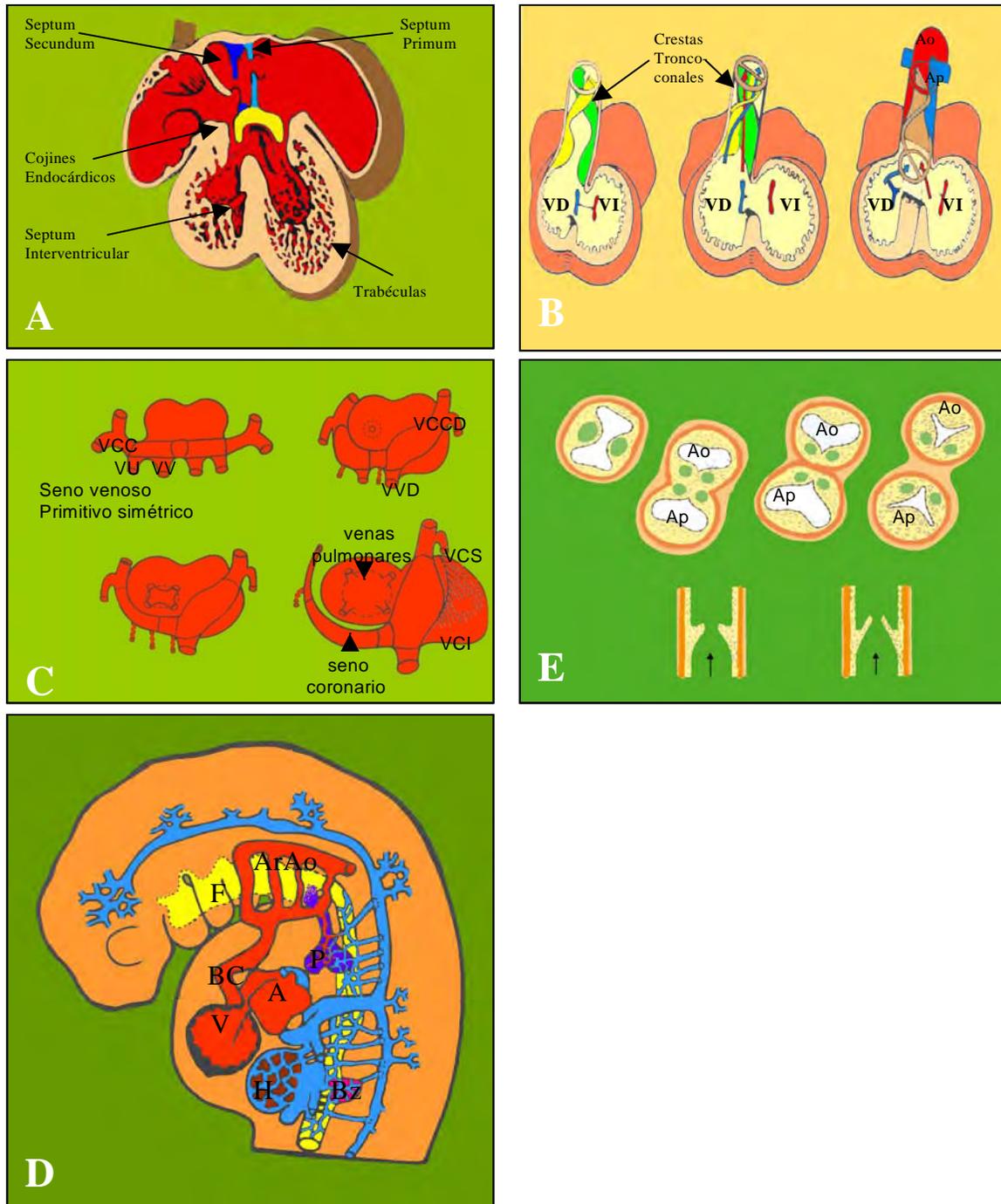


Fig. 2. Figuras del desarrollo normal del embrión y del corazón. **A.** Se esquematiza la tabicación auricular, atrioventricular y ventricular, y la trabeculación ventricular. **B.** Tabicación del tracto de salida con la formación de las crestas troncoconales. **C.** Incorporación del seno venoso y de las venas pulmonares. **D.** Formación del plexo pulmonar y su conexión con la aurícula izquierda. F: faringe, ArAo: arcos aórticos, P: yema pulmonar, BC: bulbus cordis, A: aurícula, V: ventrículo, Cc: cardinal común H: hígado, Bz: bazo. **E.** Formación de las válvulas semilunares. Tomadas de Attie F, 1985; Sadler TW, 2004; Carlson BM, 2005.

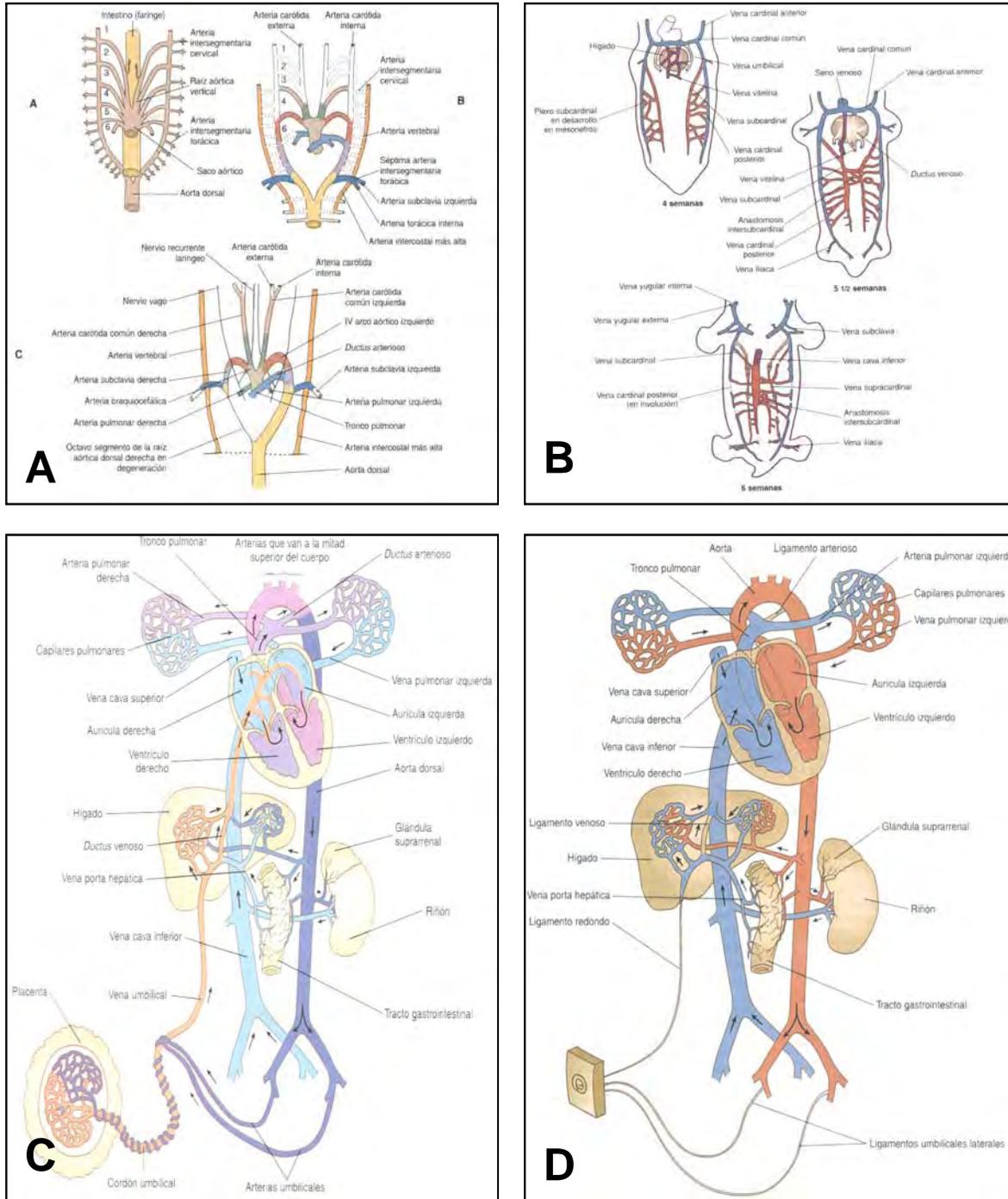


Fig. 3. Figuras del desarrollo normal del embrión y del corazón. **A.** Esquema de la formación de las arterias formadas a partir de los arcos aórticos. **B.** Esquema de la formación del sistema venoso. **C.** Circulación fetal. **D.** Circulación postnatal. Tomadas de Carlson BM, 2005.

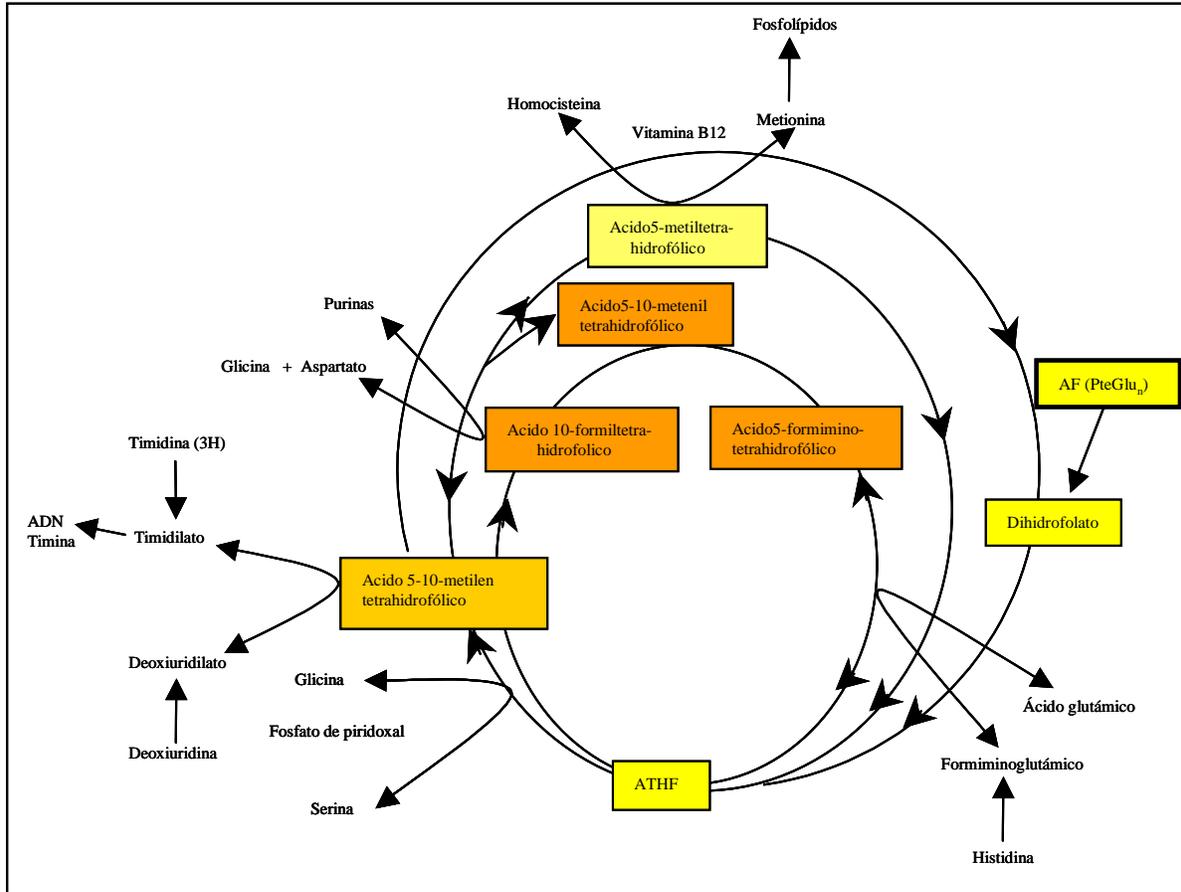


Fig. 4. Ciclo metabólico del ácido fólico.

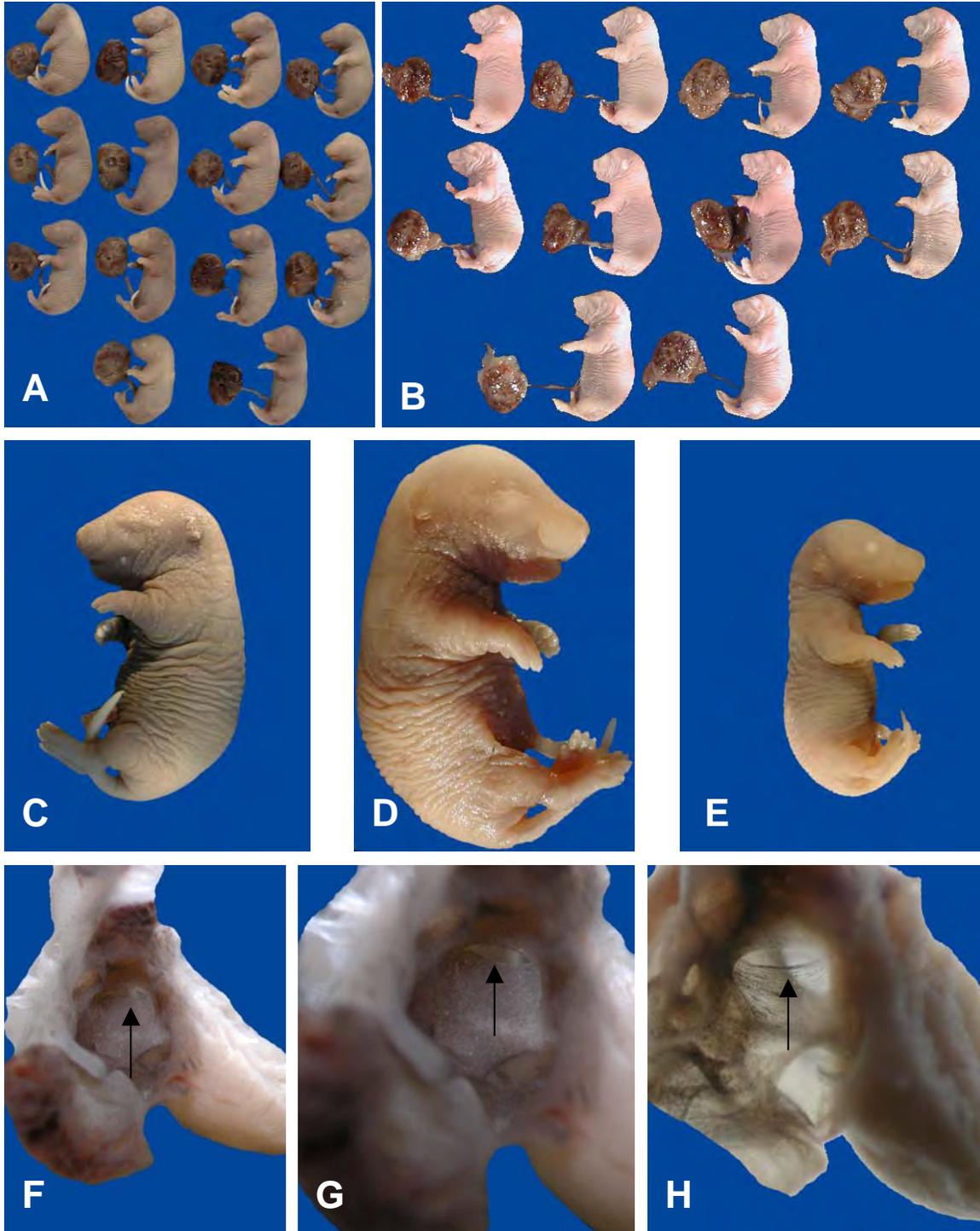


Fig. 5. Fotografías de las camadas con fetos normales. **A.** Control. **B.** Inyección salina. **C** y **D.** Fetos normales. **E.** Feto Hipotrófico. **F, G** y **H.** Corazones normales (2 controles y salina).



Fig. 6. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A**, **B** y **C**. Camadas de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.12 mg/kg. **D**. Camada de una rata inyectada el día 9° a dosis de 0.25 mg/kg.

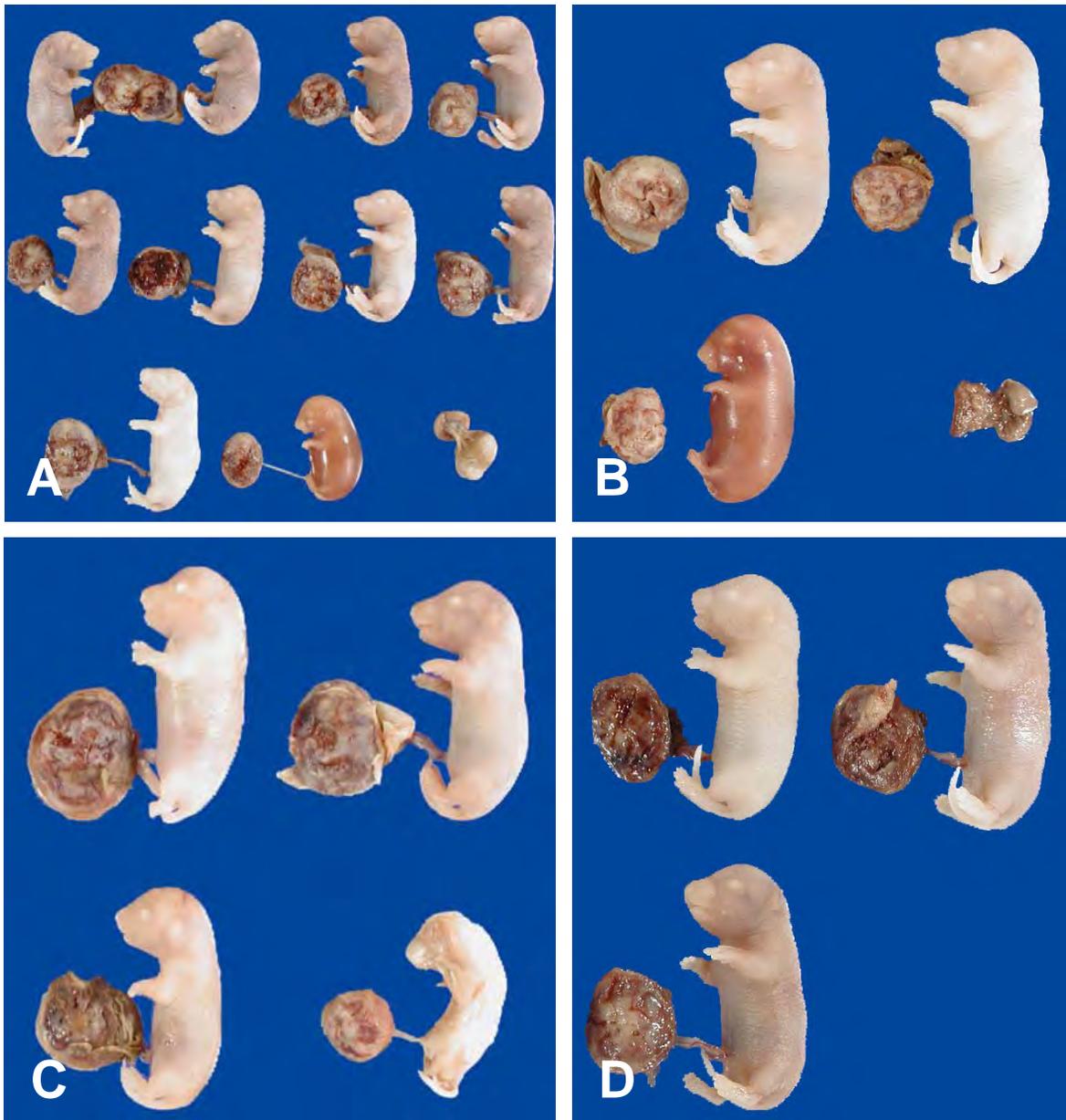


Fig. 7. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A**, **B** y **C**. Camadas de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.25 mg/kg. **D**. Camada de una rata inyectada el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg.

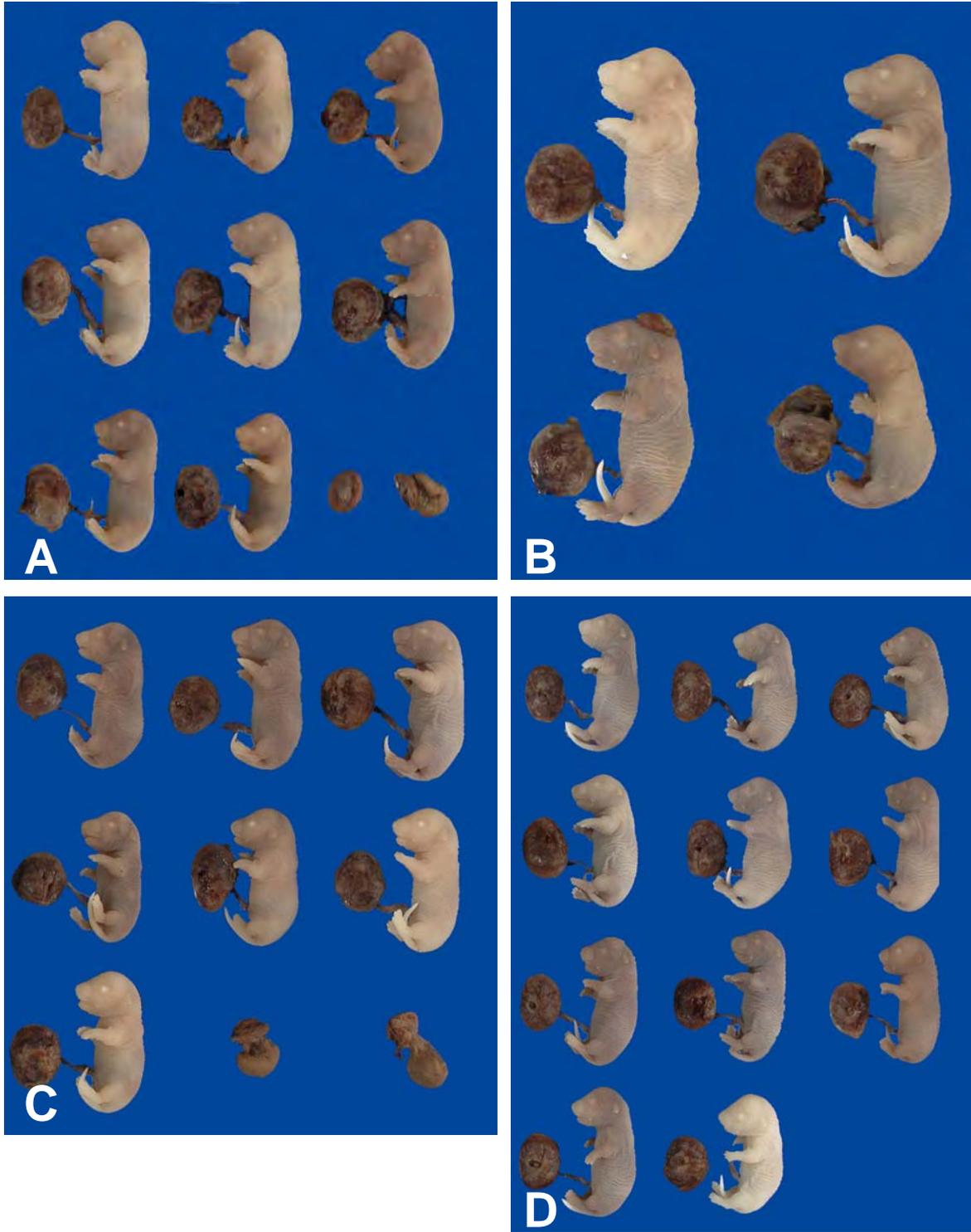


Fig. 8. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A y B.** Camadas de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg. **C y D.** Camadas de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.12 mg/kg.

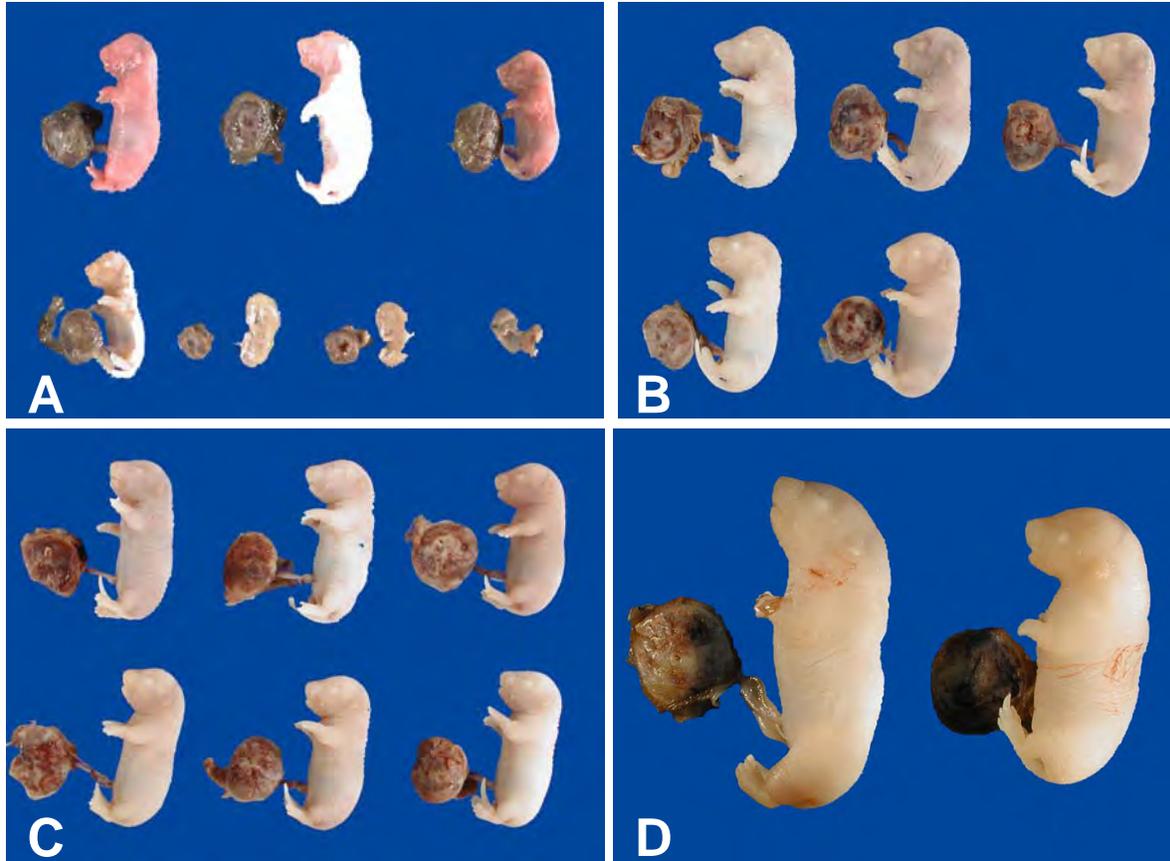


Fig. 9. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A**, **B** y **C**. Camadas de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.25 mg/kg. **D**. Camada de una rata inyectada el día 10° a dosis de 0.50 mg/kg.

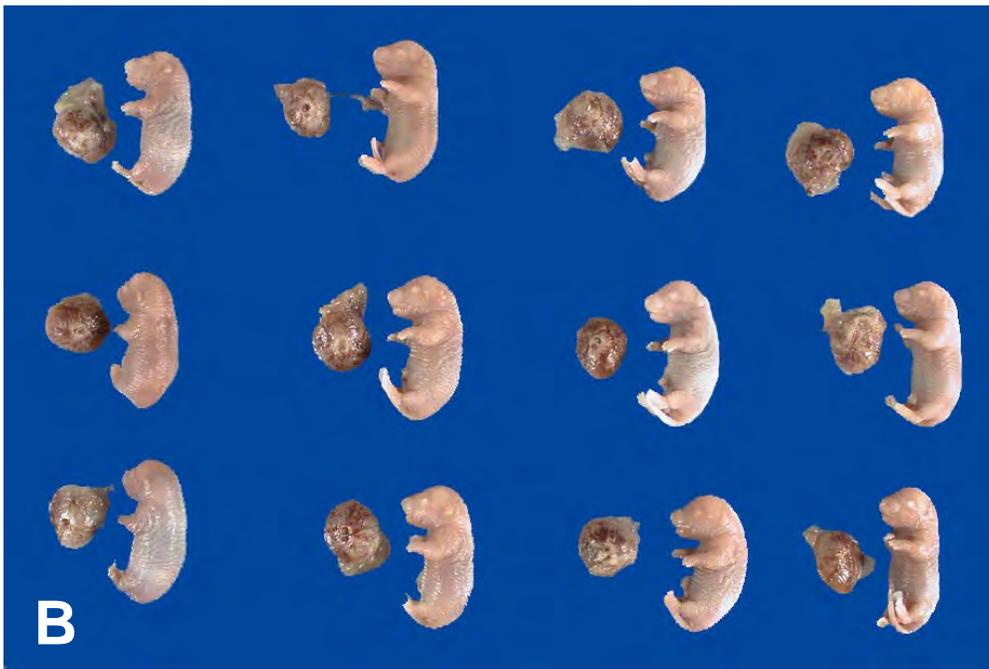


Fig. 10. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A y B.** Camadas de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.12 mg/kg.

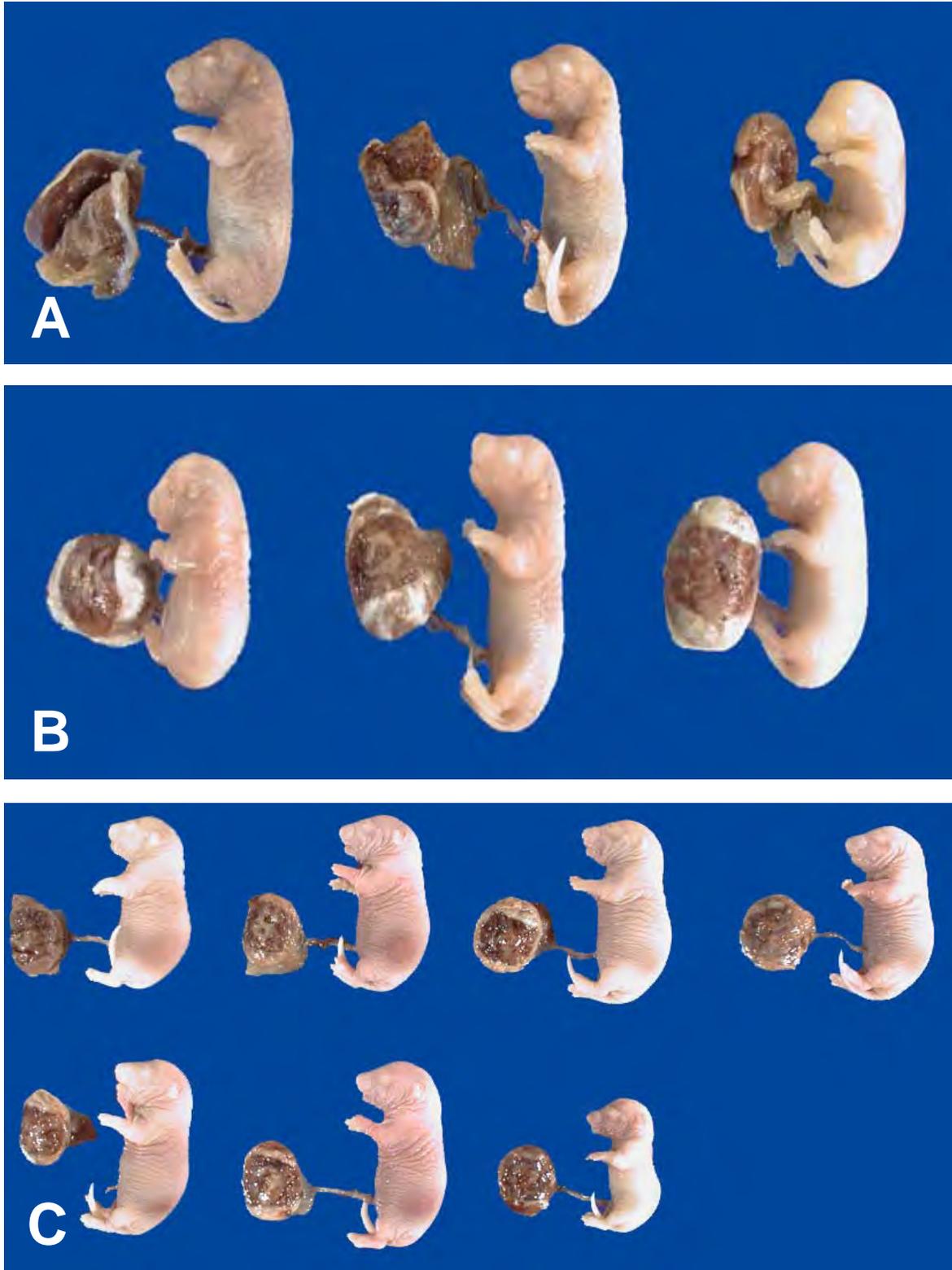


Fig. 11. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A, B y C.** Camadas de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.25 mg/kg.

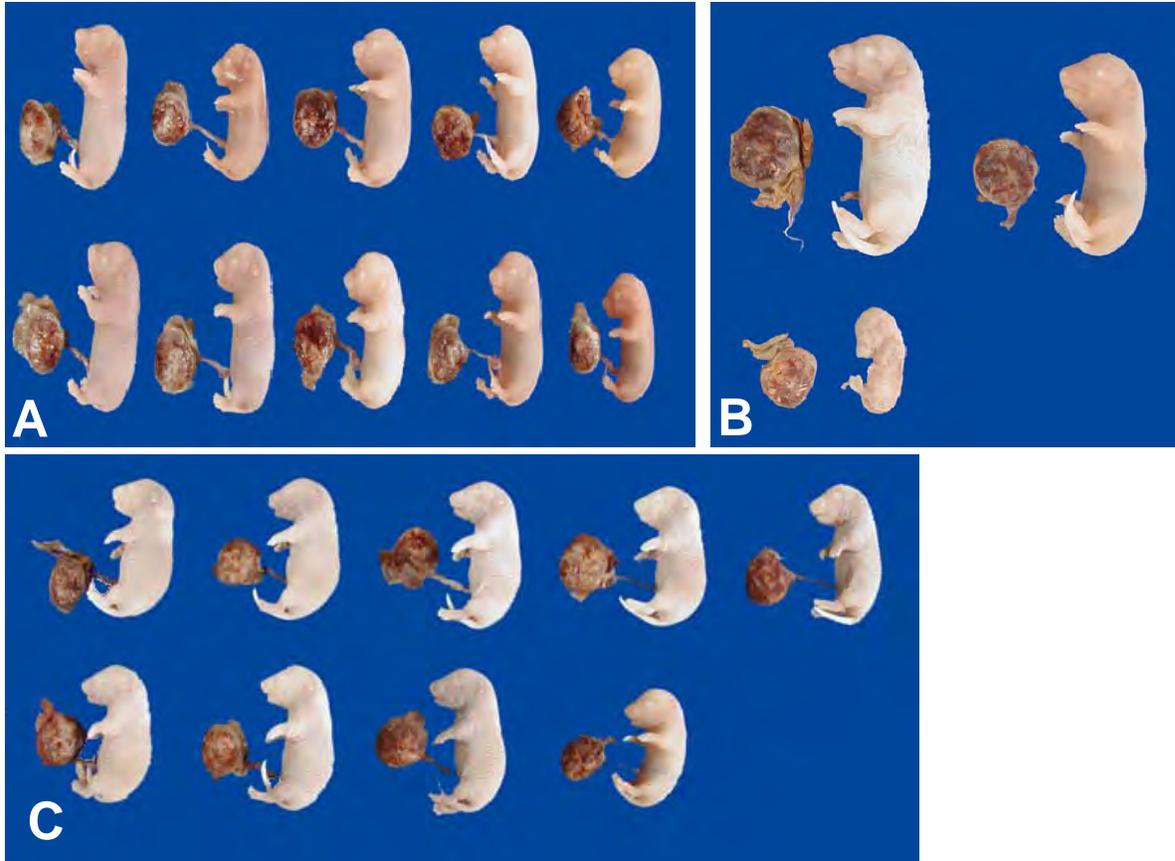


Fig. 12. Fotografías de las camadas con fetos con alteraciones externas. **A**, **B** y **C**. Camadas de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.50 mg/kg.

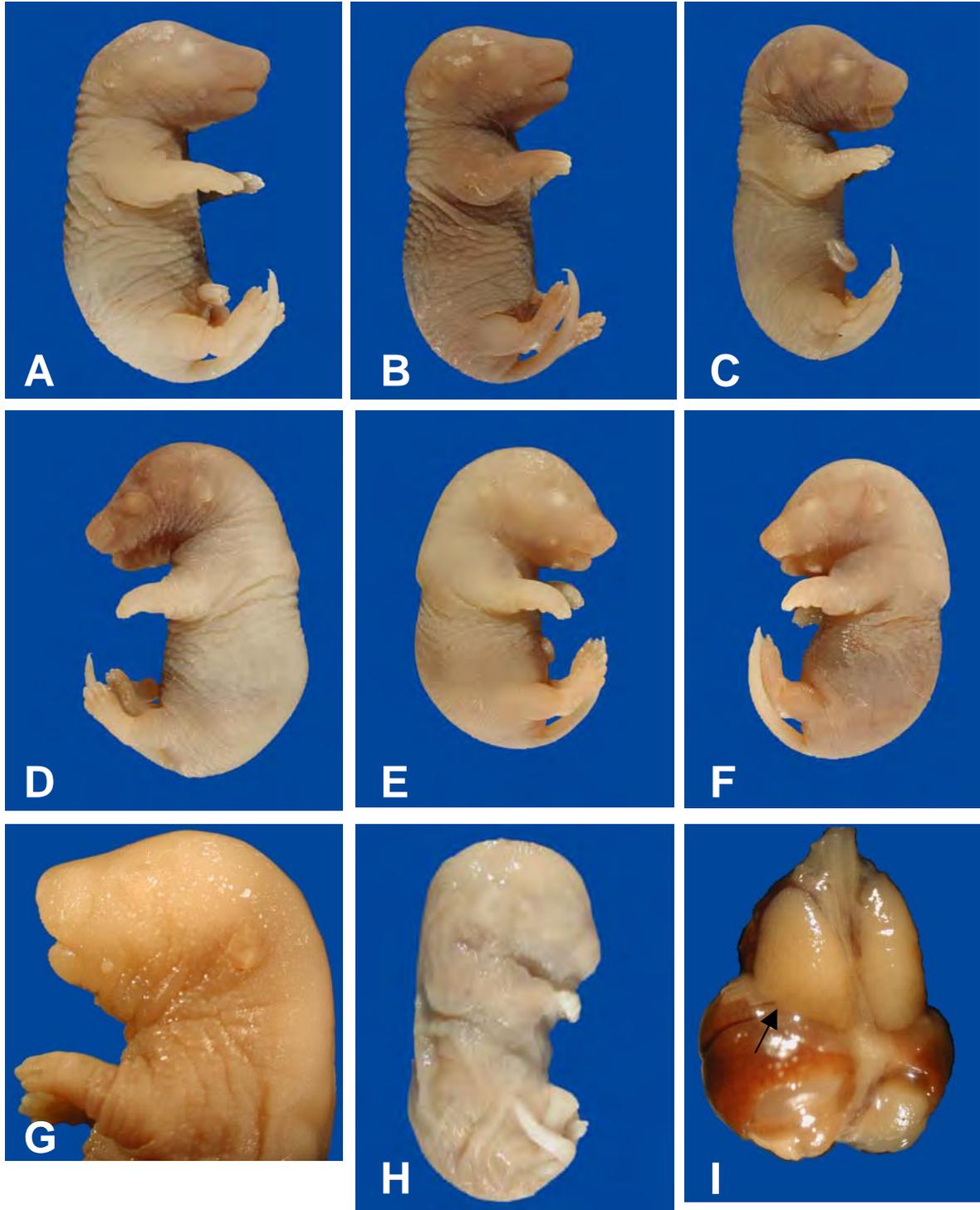


Fig. 13. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.12 mg/kg. **A, B y D.** Fetos con hipotrofia. **C, E y F.** Fetos con RCI e hipotrofia. **G.** Feto con alteraciones de cabeza. **H.** Feto muerto. **I.** Hipoplasia pulmonar.

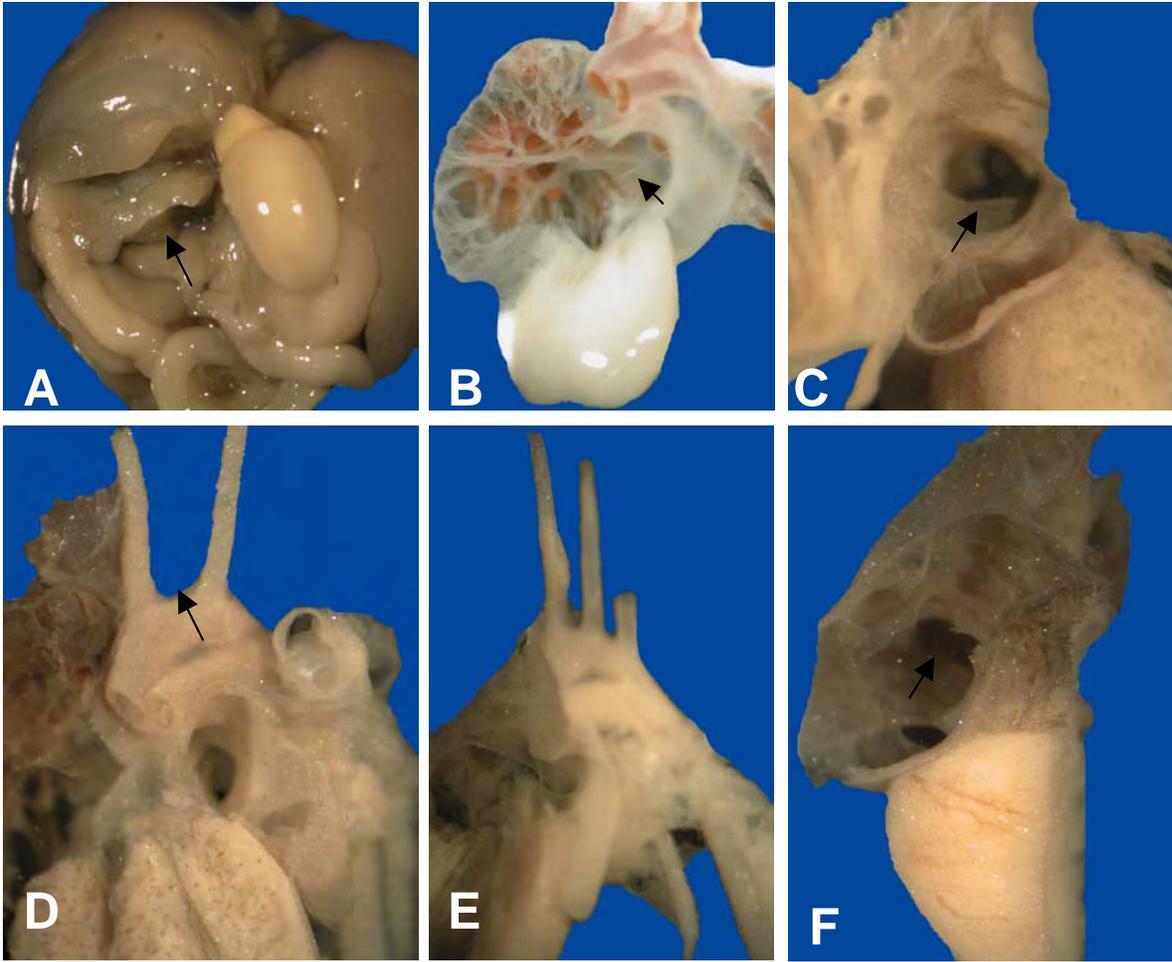


Fig. 14. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.12 mg/kg. **A.** Páncreas bífido. **B, C y F.** Comunicación interatrial. **D.** Ausencia de subclavia. **E.** Cayado aórtico normal, fotografía de comparación para la fotografía D.

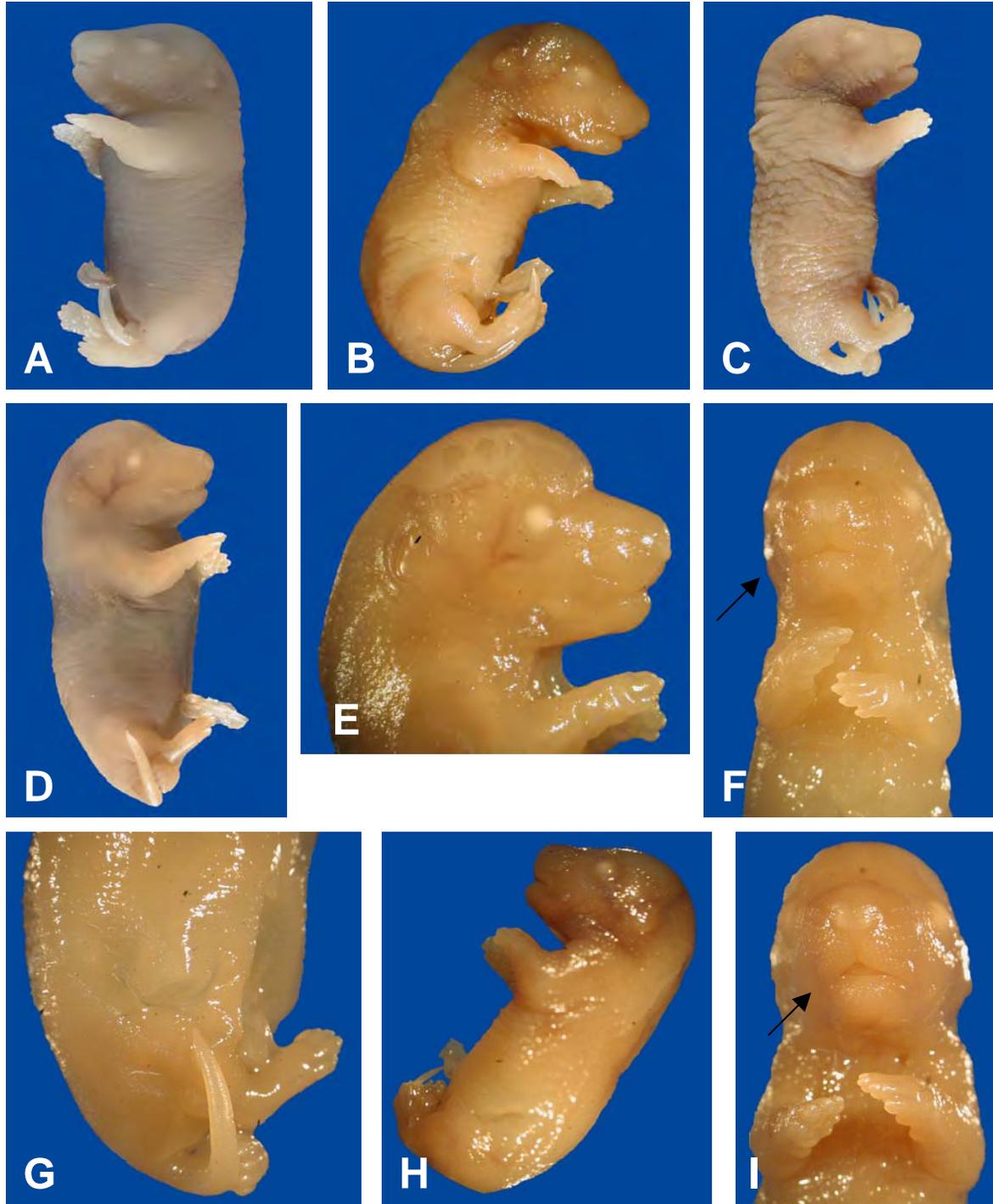


Fig. 15. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.25 mg/kg. **A.** Feto con edema. **B.** Feto Hipotrófico y RCI. **C.** Feto con RCI. **D.** Feto con alteraciones de cabeza, cola y extremidades. **E y F.** Feto con alteraciones craneales y faciales. **G.** Alteraciones de cauda y extremidades. **H.** Feto Hipotrófico. **I.** Asimetría facial.

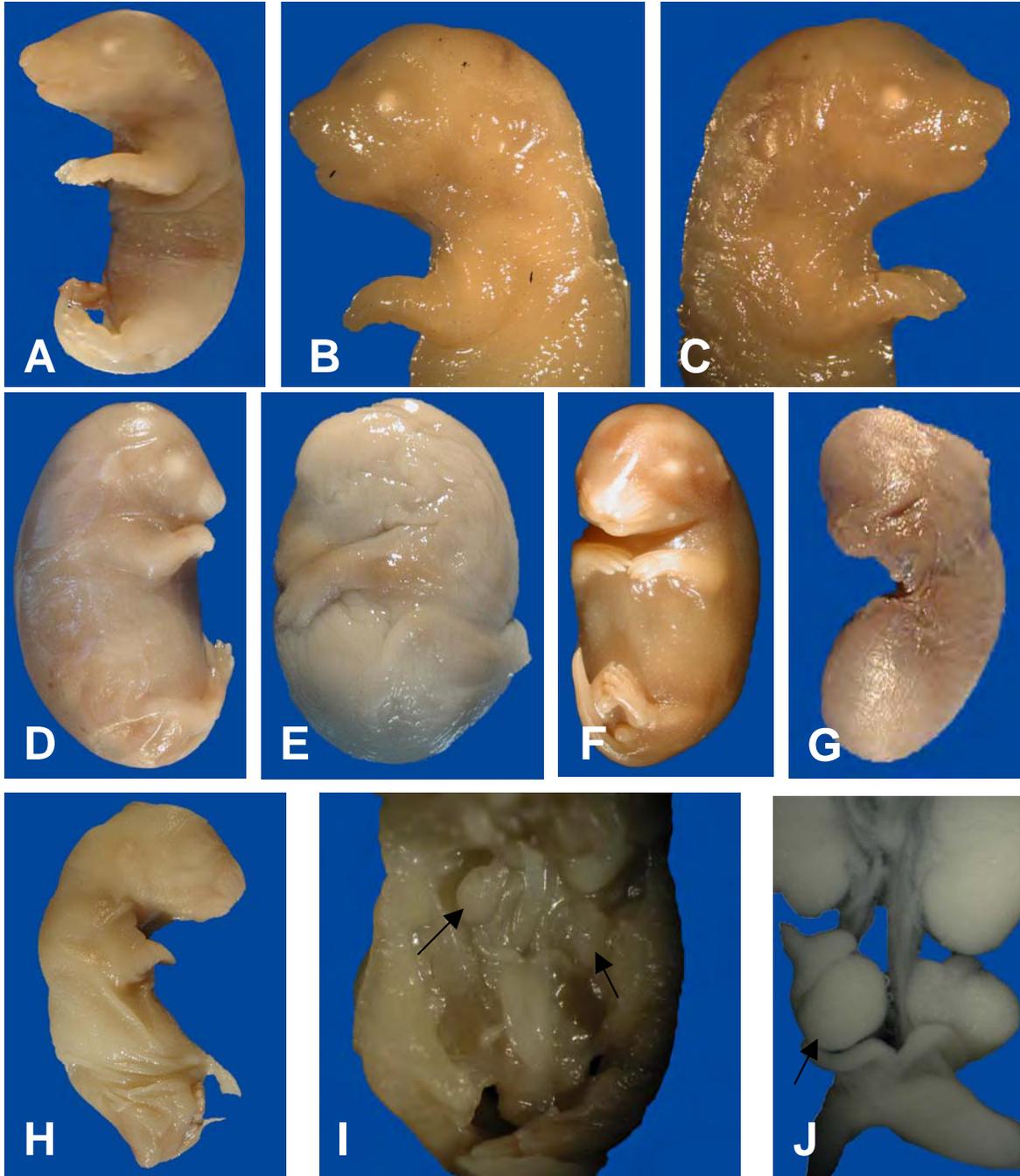


Fig. 16. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.25 mg/kg. **A.** Feto con hipotrofia y RCI. **B y C.** Feto con micrognatia. **D, E, F, G y H.** Fetos muertos. **I y J.** Criptorquidia.

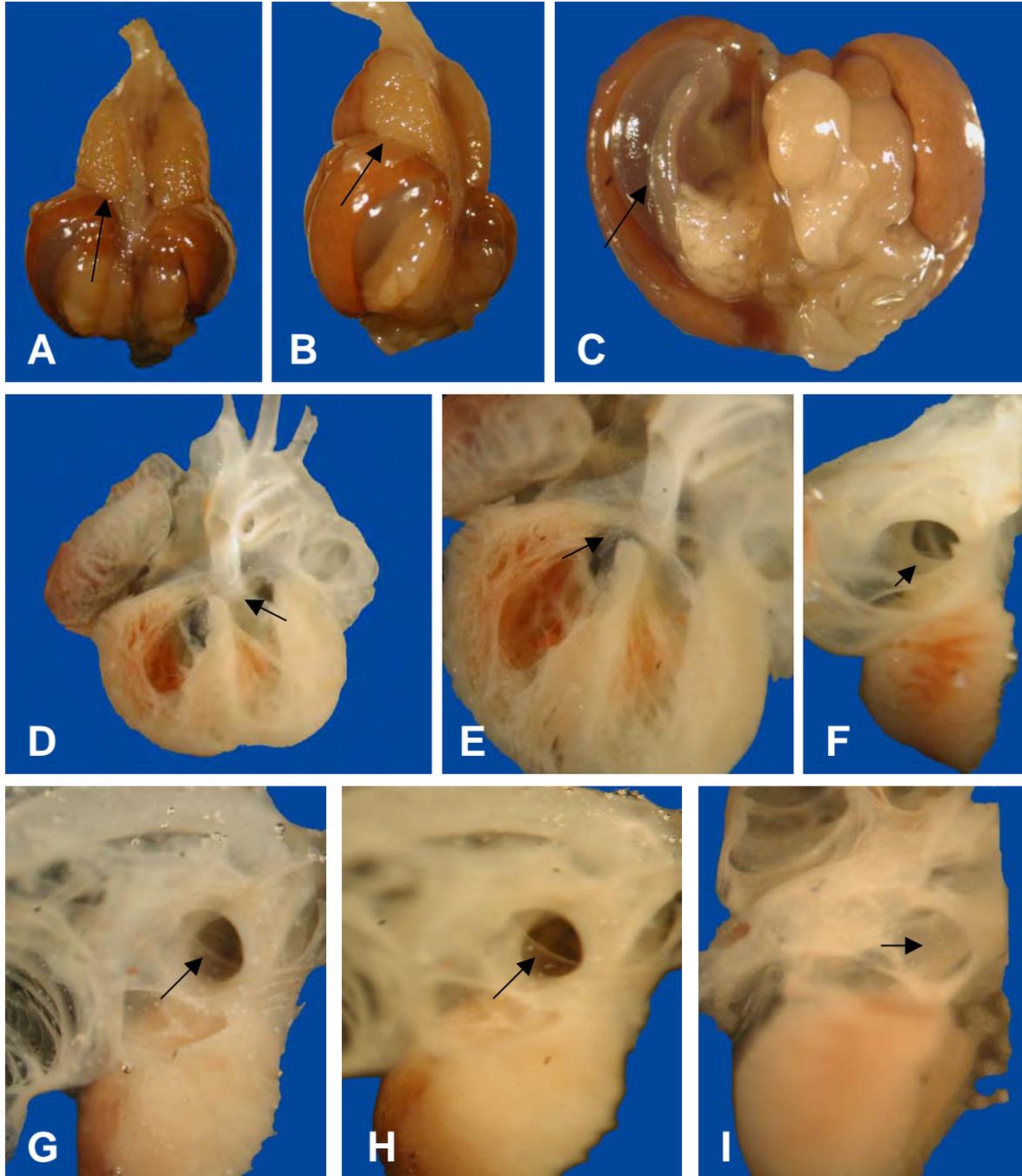


Fig. 17. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.25 mg/kg. **A y B.** Hipoplasia pulmonar. **C.** Bazo hipoplásico. **D y E.** Comunicación interventricular. **F, G, H e I.** Comunicación interatrial.



Fig. 18. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg. **A y B.** Fetos con RCI. **C, D y E.** Fetos con hipotrofia y RCI. **F, G y H.** Feto con RCI y DTN. **I.** Feto con RCI y alteración de extremidades.

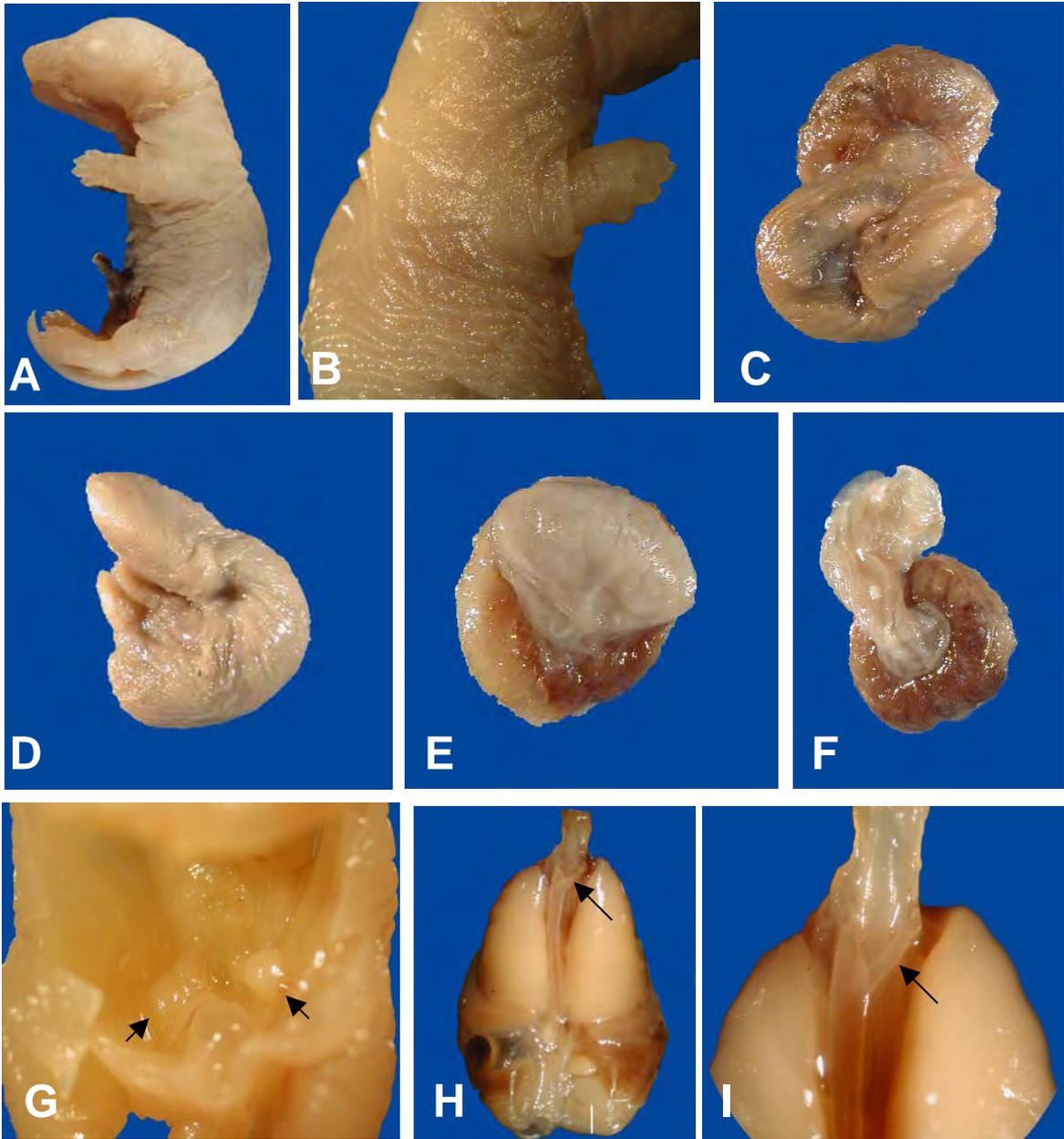


Fig. 19. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg. **A.** Feto con RCI y alteración de extremidades. **B.** Acercamiento a feto con alteración de extremidades. **C, D, E y F.** Fetos muertos. **G.** Criptorquidia. **H e I.** Anillo aórtico.

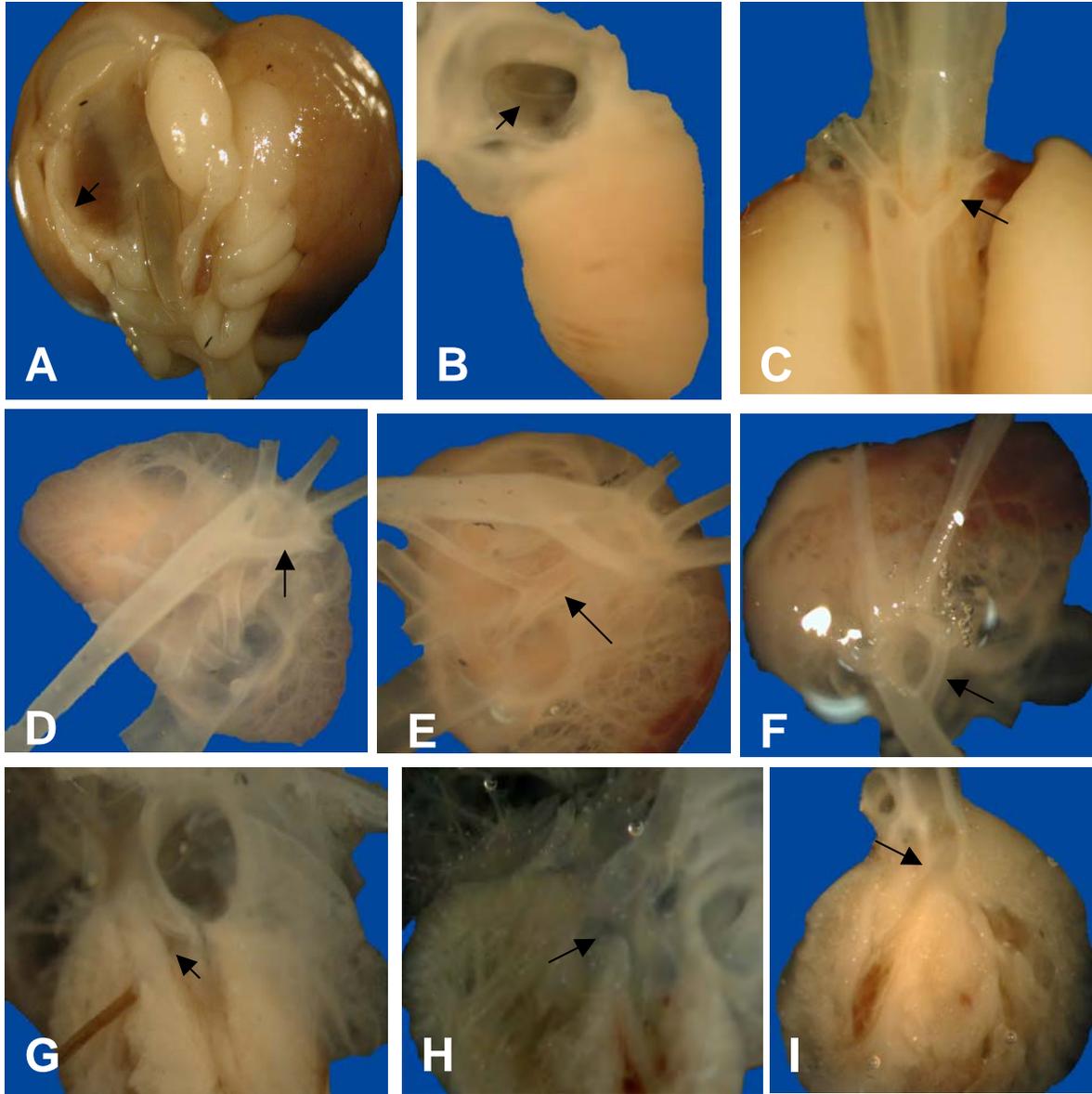


Fig. 20. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg. **A.** Páncreas hipoplásico. **B.** Comunicación interatrial. **C, D y F.** Anillo aórtico. **E.** Anillo aórtico con rama única de la arteria pulmonar. **G, H e I.** Comunicación interventricular.

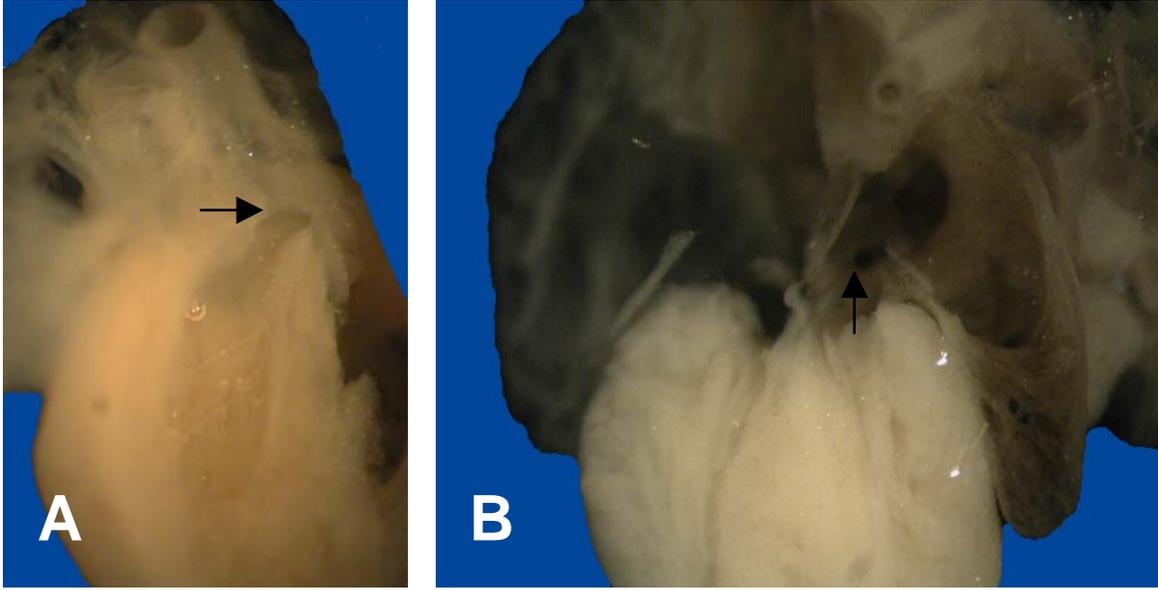


Fig. 21. Fotografías de las ratas inyectadas el día 9° a dosis de 0.50 mg/kg. **A.** Comunicación interventricular. **B.** Comunicación interatrial tipo septum primum.

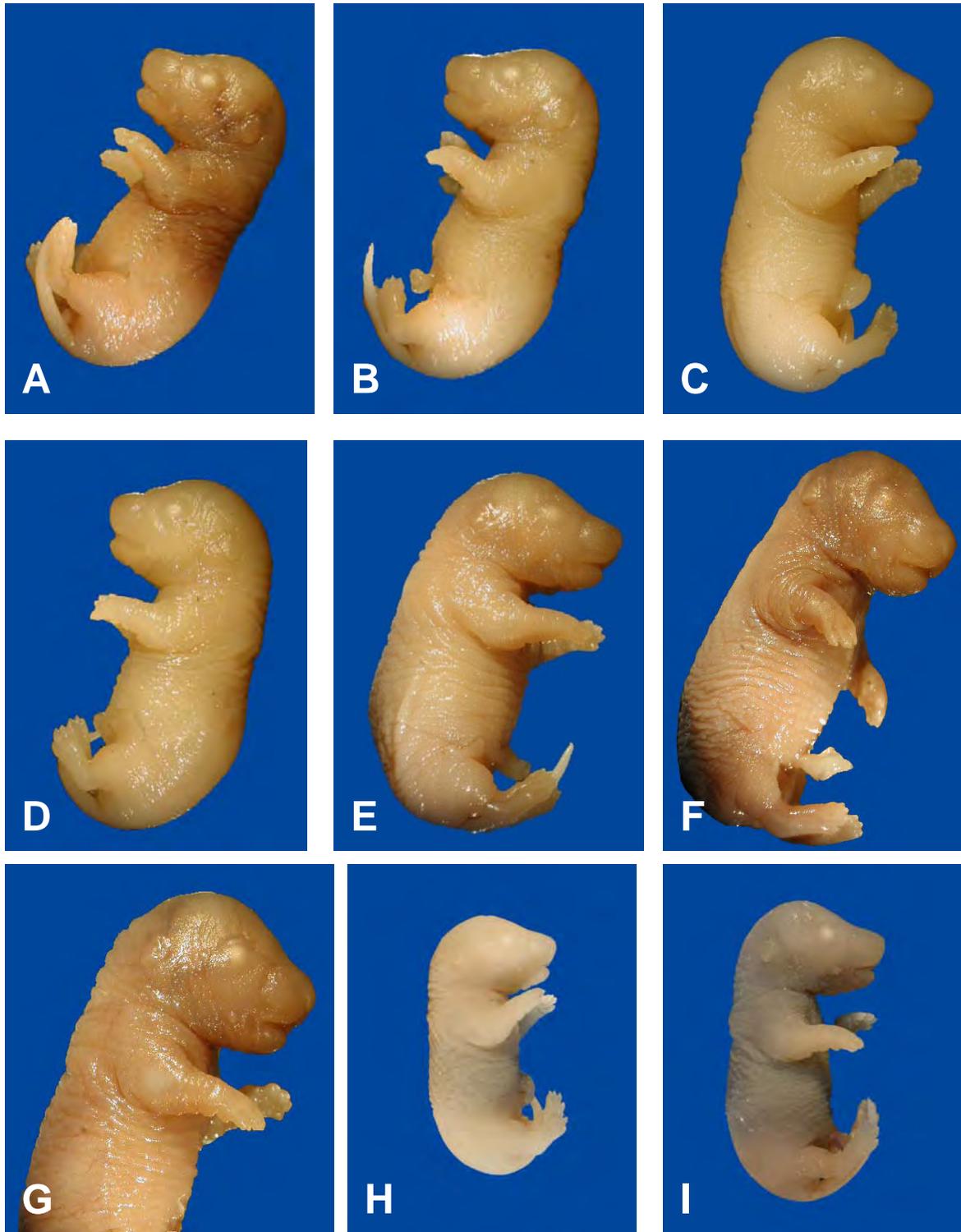


Fig. 22. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.12 mg/kg. **A-D.** Fetos con RCI e hipotrofia. **E y F.** Fetos edematizados. **G.** Feto con RCI y edema. **H e I.** Fetos con RCI e hipotrofia.

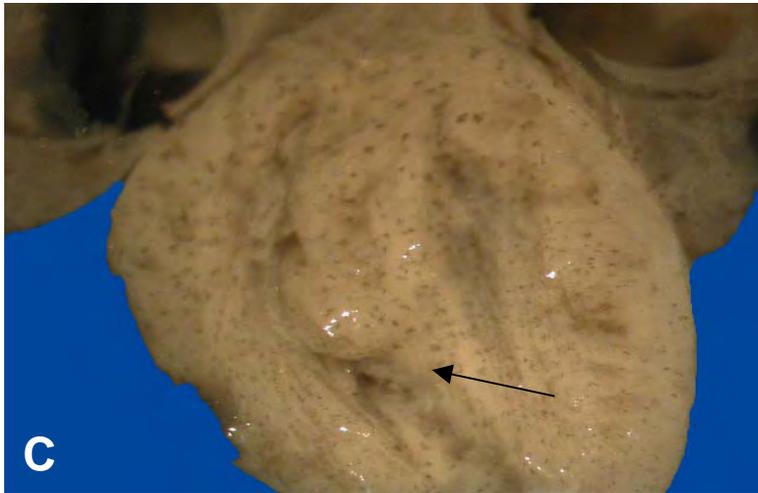


Fig. 23. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.12 mg/kg. **A y B.** Fetos muertos. **C.** Comunicación interventricular.

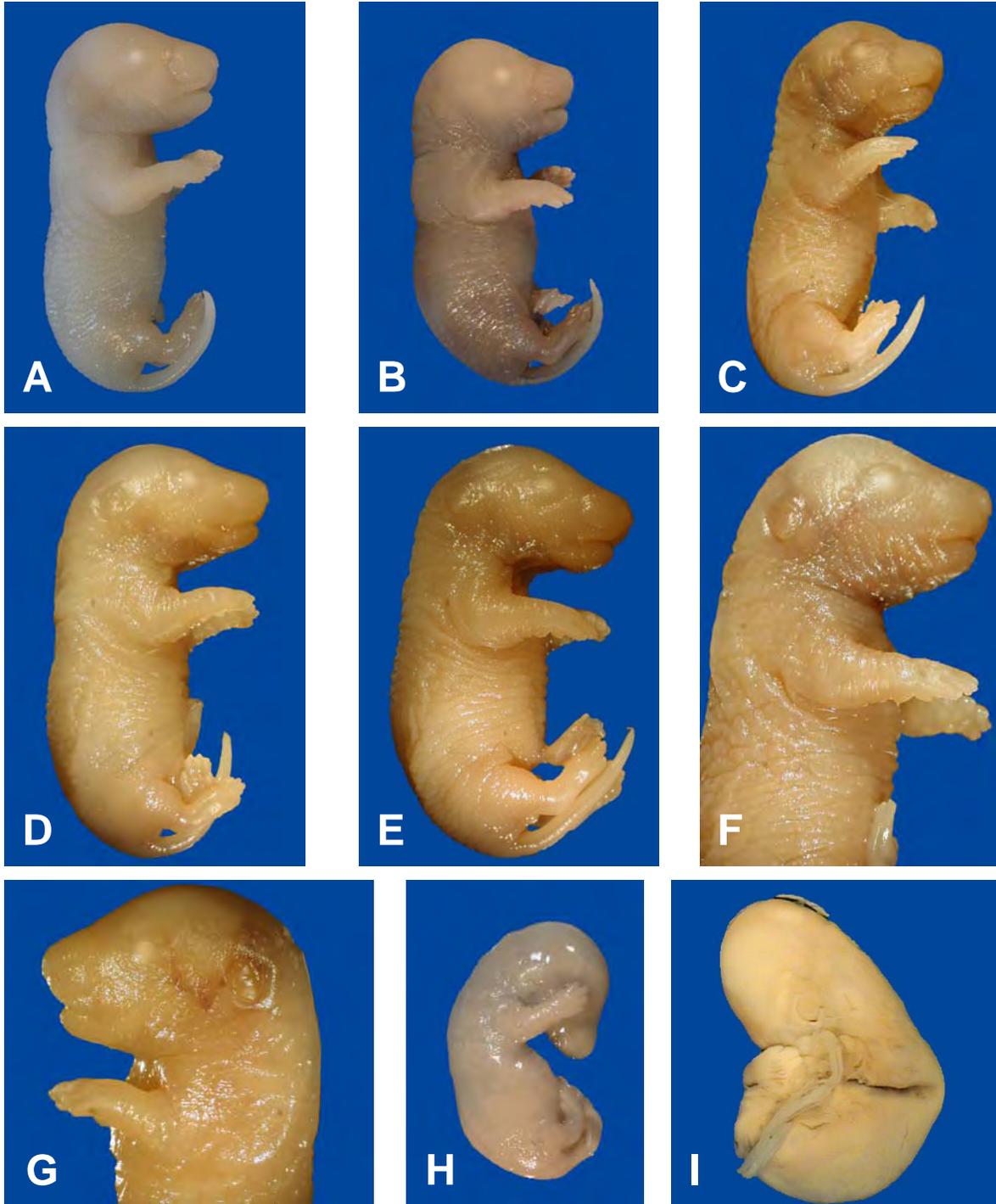


Fig. 24. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.25 mg/kg. **A-D.** Fetos con RCI e hipotrofia. **E.** Feto con RCI. **F.** Feto con edema. **G.** Feto con edema y alteraciones faciales y de extremidades. **H e I.** Fetos muertos.

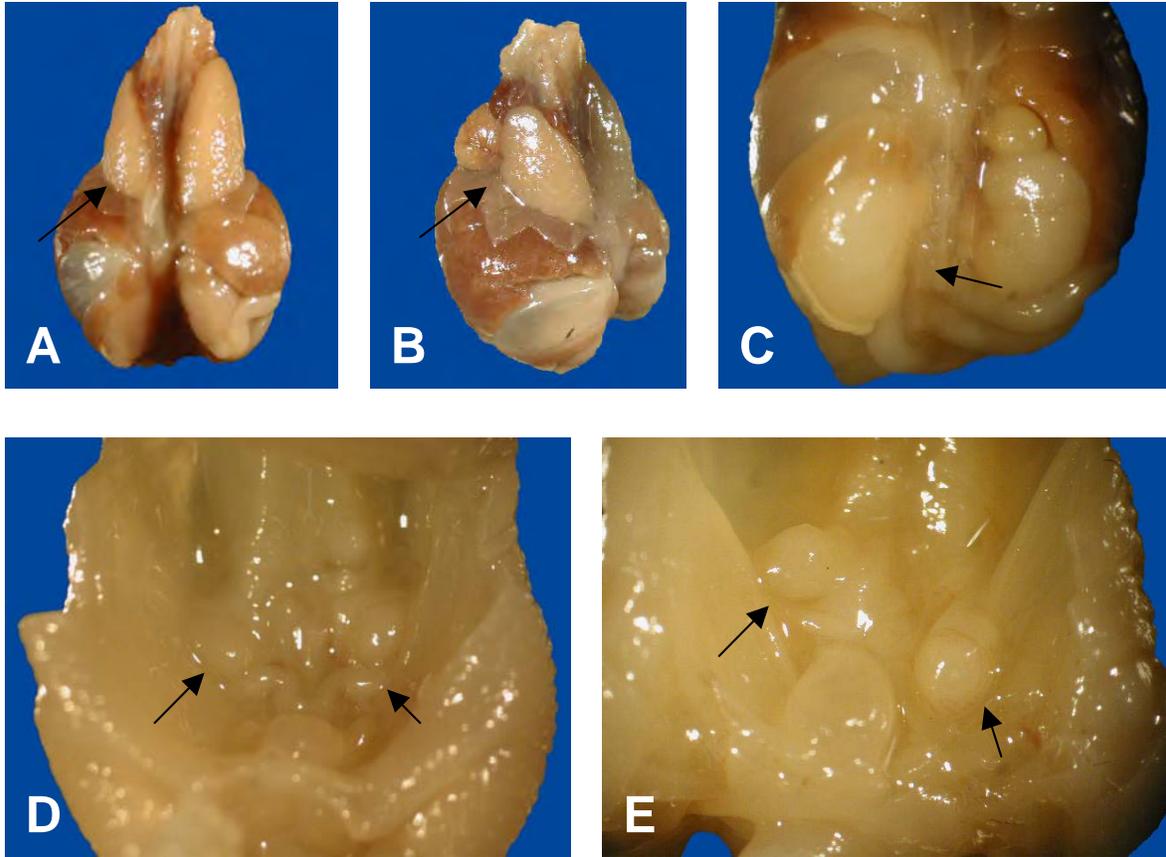


Fig. 25. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.25 mg/kg. **A y B.** Pulmones hipoplásicos. **C.** Falta de ascenso renal. **D y E.** Criptorquidia.

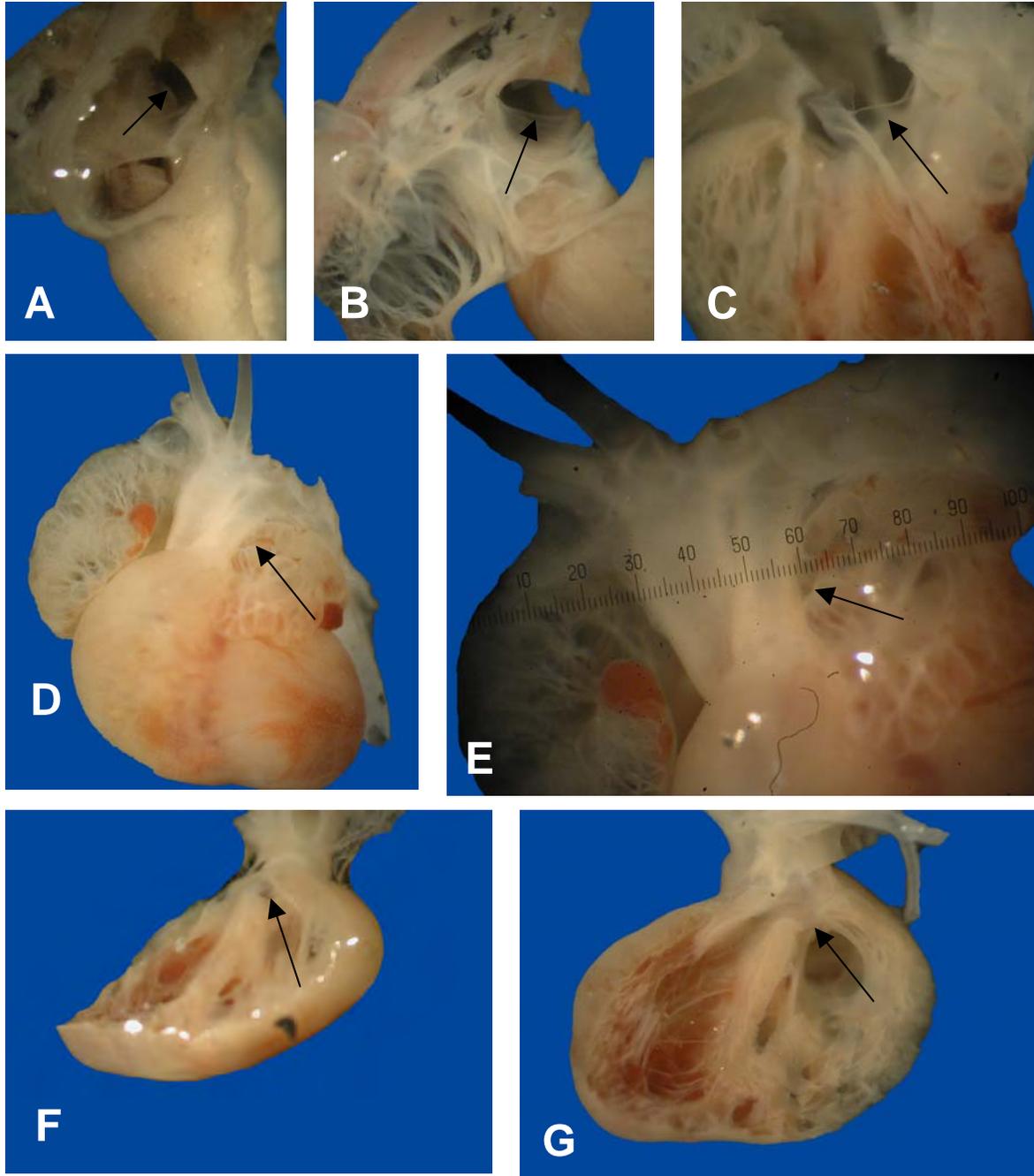


Fig. 26. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.25 mg/kg. **A-C.** Comunicación interatrial. **D y E.** Estenosis pulmonar. **F y G.** Comunicación interventricular y cabalgamiento de la aorta (Tetralogía de Fallot).

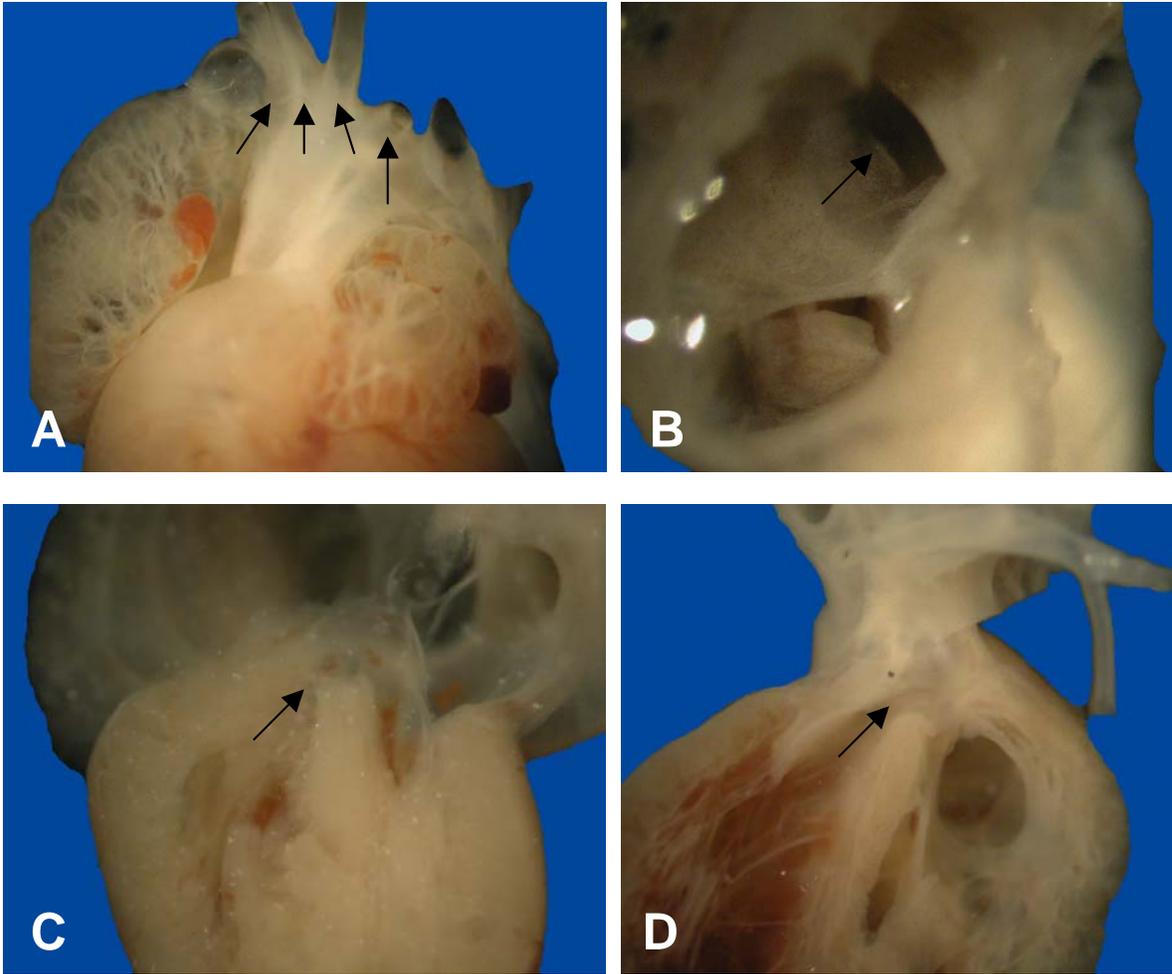


Fig. 27. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.25 mg/kg. **A.** Cuatro vasos sanguíneos saliendo del arco aórtico. **B.** Comunicación interatrial. **C y D.** Comunicación interventricular, en D con cabalgamiento de la aorta.

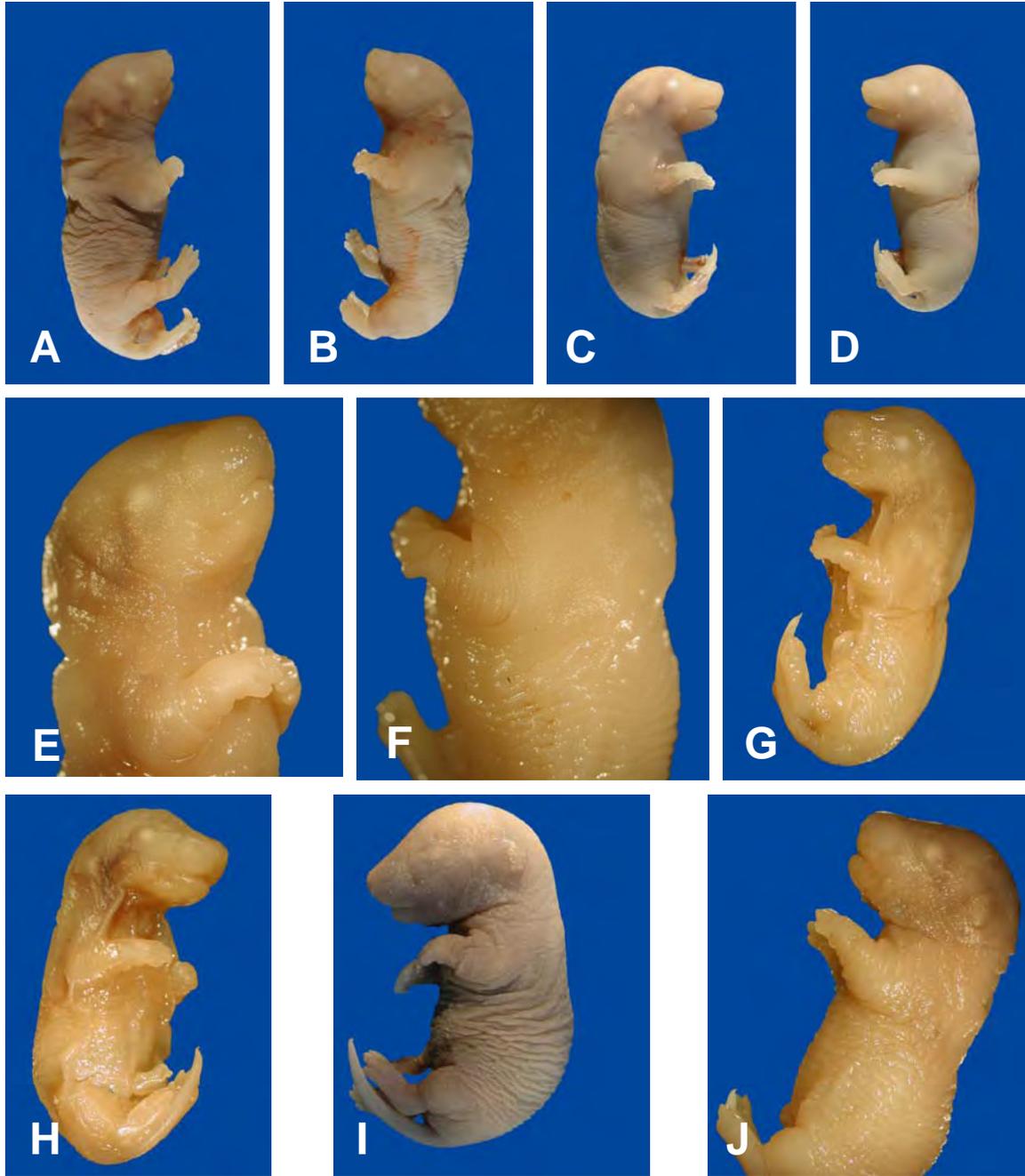


Fig. 28. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.50 mg/kg. **A, B, E y F.** Feto con hipotrofia y malformaciones de cabeza, cuello, cola y extremidades. **C, D, G y H.** Feto con RCI y edema. **I.** Feto Hipotrófico. **J.** Feto con edema.

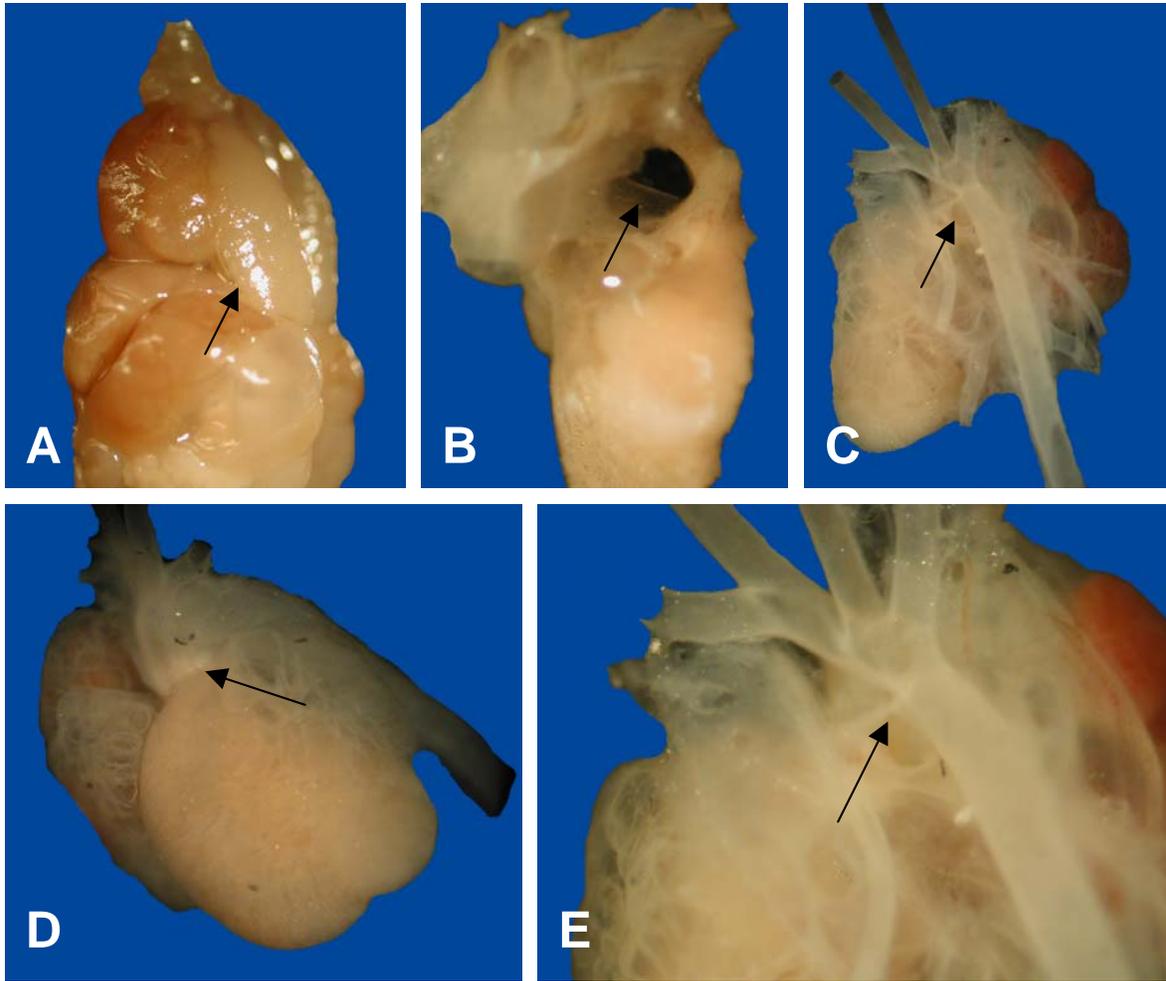


Fig. 29. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.50 mg/kg. **A.** Pulmones hipoplásicos. **B.** Comunicación interatrial. **C-E.** Arco aórtico derecho.

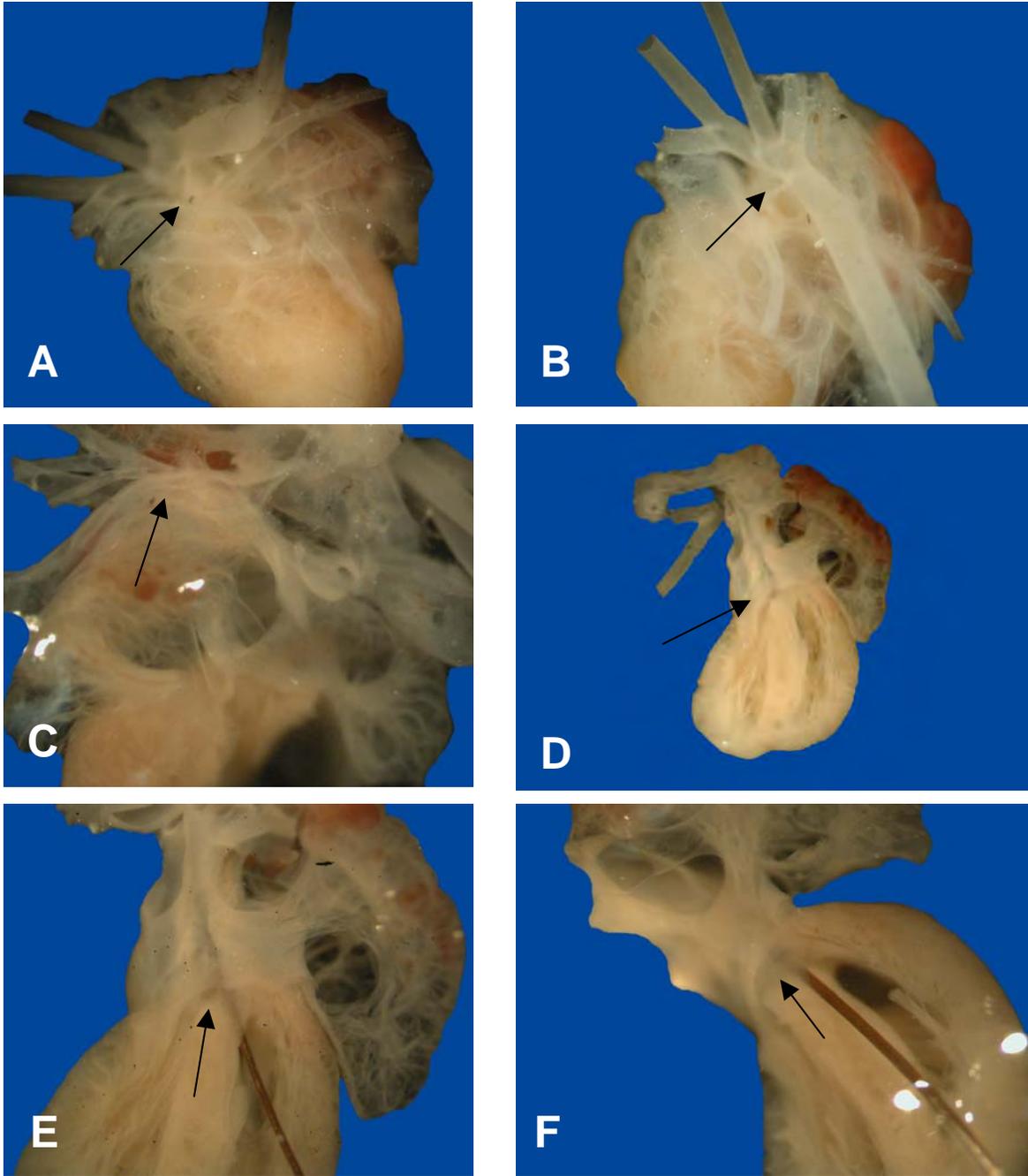


Fig. 30. Fotografías de las ratas inyectadas el día 10° a dosis de 0.50 mg/kg. **A-C.** Arco aórtico derecho y alteraciones del sistema venoso. **D-F.** Comunicación interventricular y cabalgamiento aórtico.

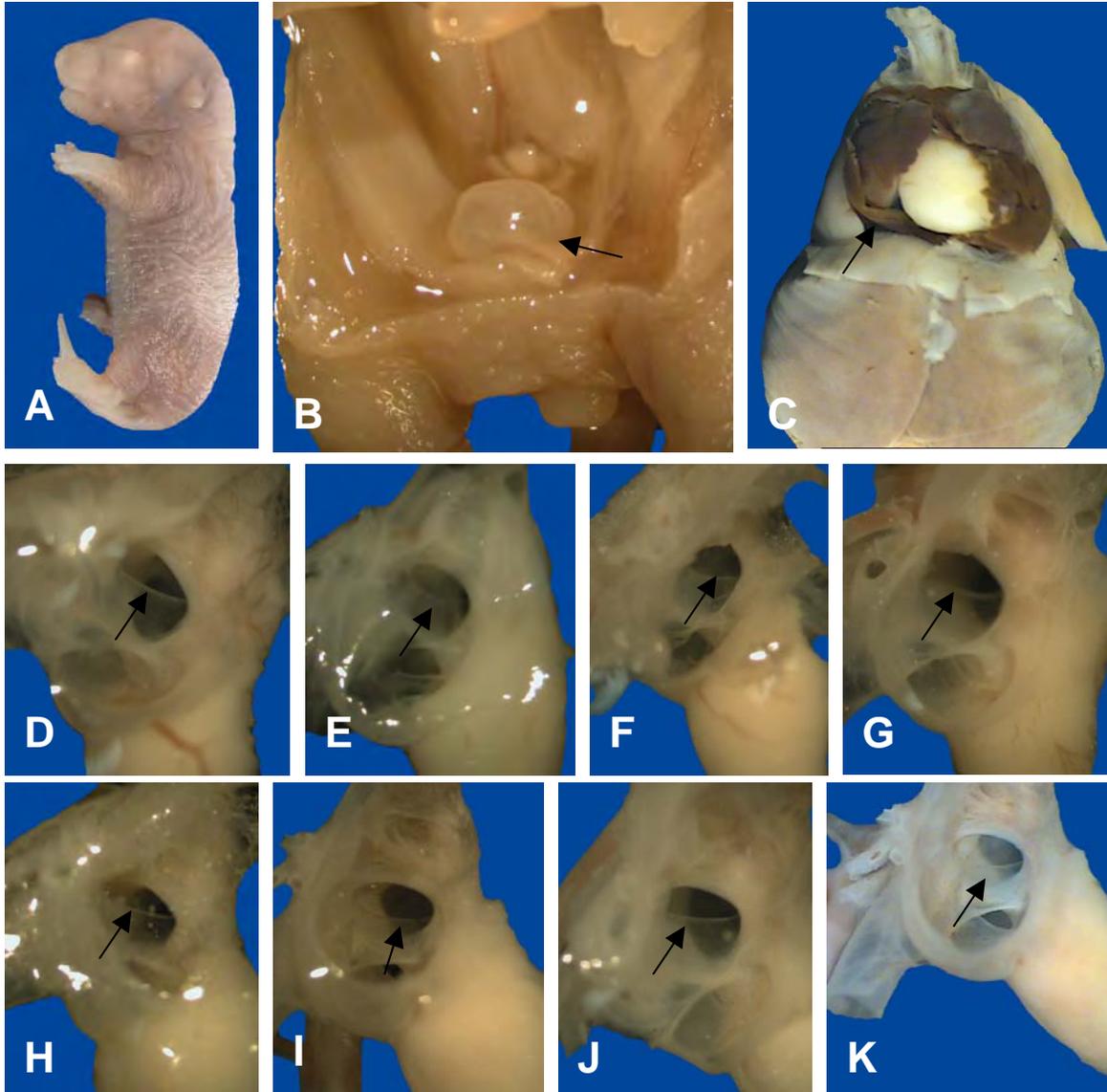


Fig. 31. Fotografías de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.12 mg/kg. **A.** Feto con edema. **B.** Distensión vesical. **C.** Hemopericardio. **D-K.** Comunicación interatrial.

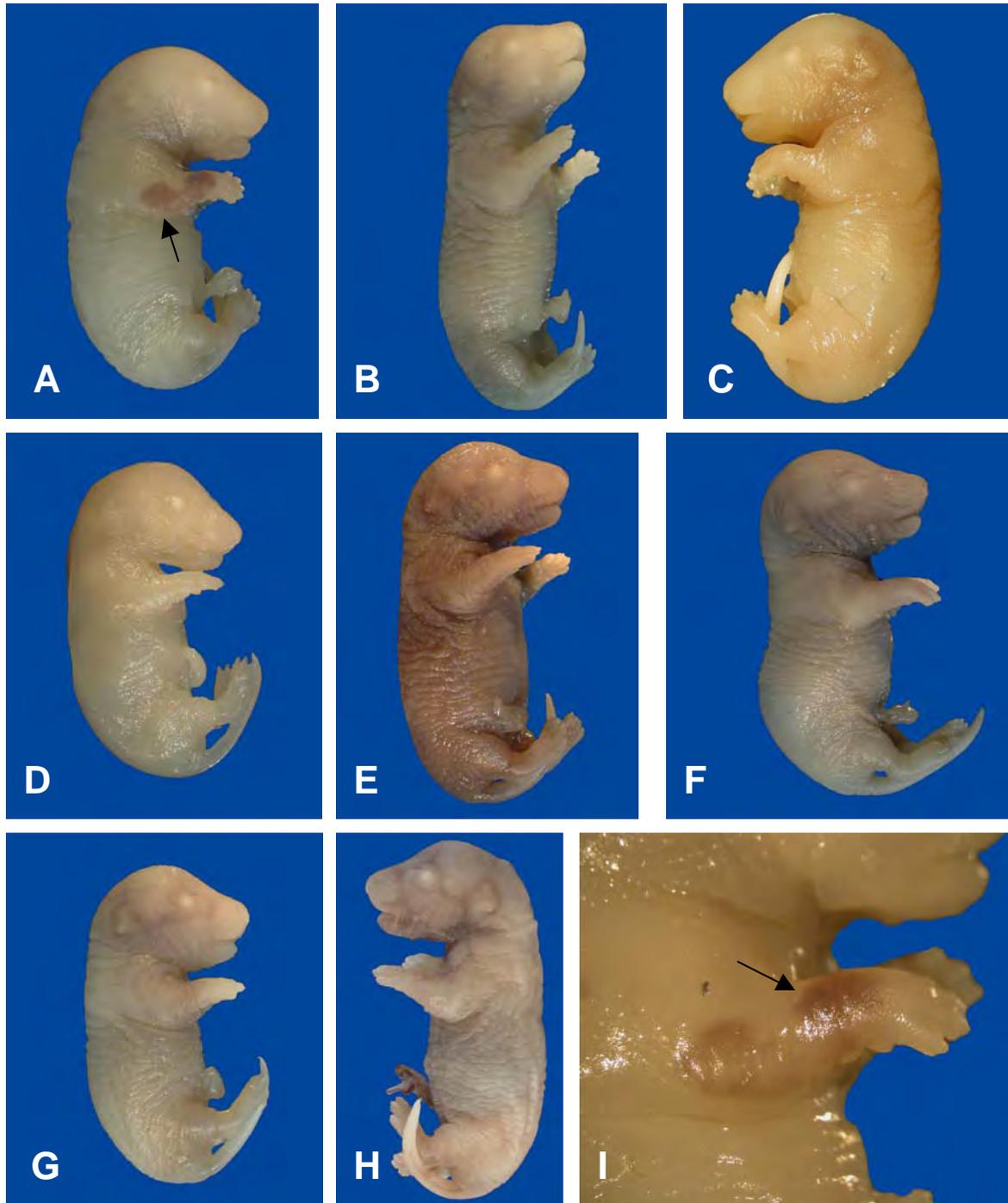


Fig. 32. Fotografías de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.25 mg/kg. **A.** Feto edematizado y con hematoma en extremidad superior derecha. **B y C.** Fetos edematizados. **D y G.** Fetos hipotróficos con RCI. **E y H.** Fetos hipotróficos. **F.** Feto Hipotrófico con lordosis. **I.** Hematoma en extremidad superior.

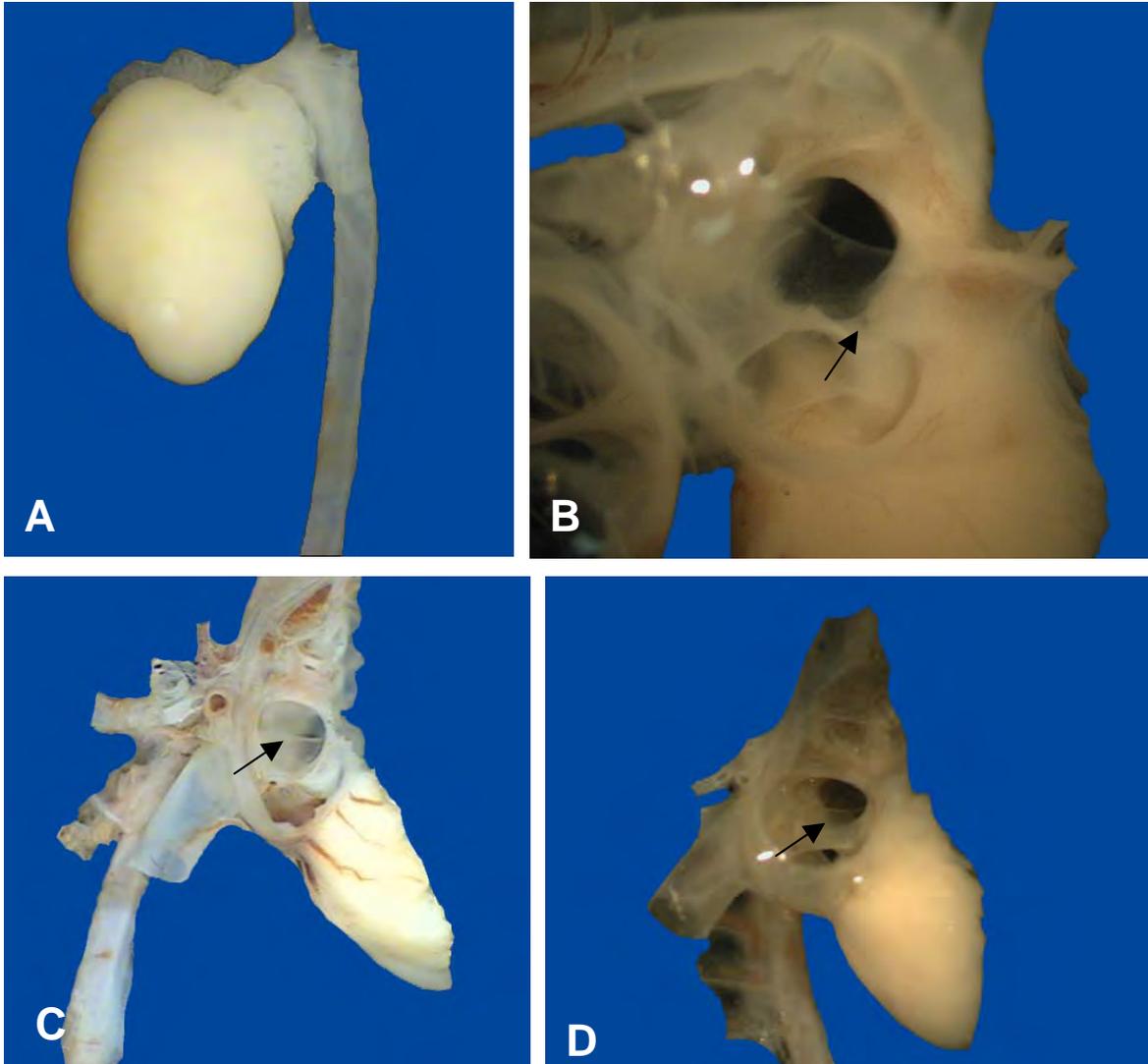


Fig. 33. Fotografías de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.25 mg/kg. **A.** Estenosis pulmonar. **B.** Comunicación interatrial tipo septum primum. **C y D.** Comunicación interatrial.

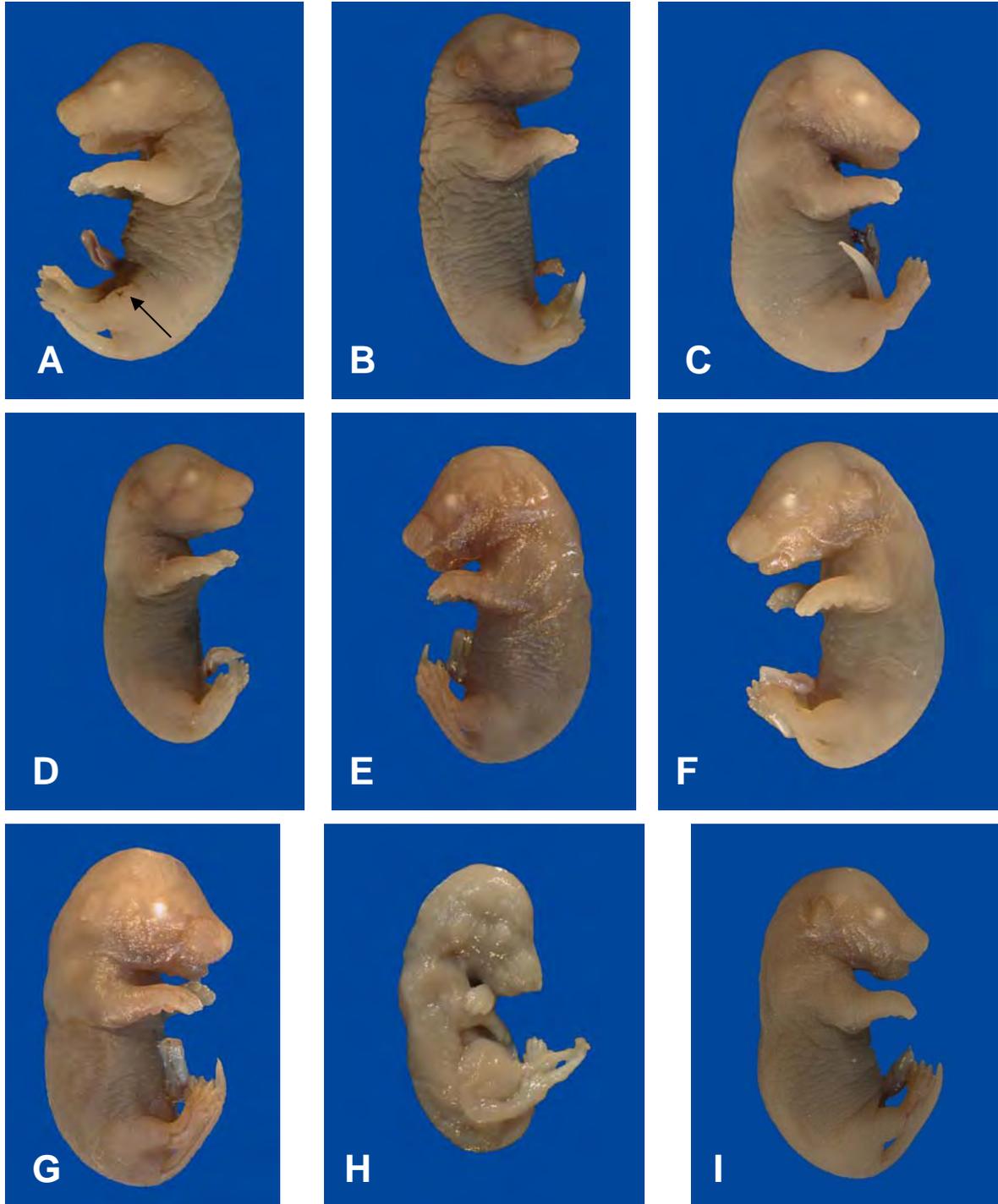


Fig. 34. Fotografías de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.50 mg/kg. **A.** Hipotrófico con hematoma en rodilla izquierda. **B.** Feto con RCI. **C** e **I.** Feto hipotrófico. **D-G.** Fetos hipotróficos con RCI. **H.** Feto muerto.



Fig. 35. Fotografías de las ratas inyectadas el día 12° a dosis de 0.50 mg/kg. **A-C.** Anillo aórtico. **D.** Comunicación interatrial. **E y F.** Coartación aórtica.

7. DISCUSION

7.1. PATOGENIA

El eje de la patogenia de las malformaciones asociadas al ácido fólico durante el embarazo es que se requiere mayor cantidad de folatos por el aumento en la multiplicación celular y por lo tanto en la síntesis de DNA.

El mecanismo que se sugiere en la patogenia consiste en una falla en la conducción y/o metabolismo o deficiencias en el transporte de los folatos celulares fetales y maternos que provoca deficiencia en la metilación de componentes requeridos en diversas vías metabólicas, por ejemplo en la síntesis de poliaminas y ácidos nucleicos esenciales en la formación de DNA (Cotran, 1996; Méndez e Inocencio, 2005).

Los folatos tienen un rol indirecto en la síntesis de poliaminas, metilación de DNA y RNA. Estas reacciones ayudan directamente a la expresión de genes y proliferación celular que suceden considerablemente durante el embarazo. El 5,10-metilenFH₄ cataliza la reacción de desoxiuridilato a timidilato, paso cardinal durante la fase S del ciclo celular que permite proseguir la síntesis de DNA. La síntesis de nucleótidos involucra la síntesis de *nov*o de adenina y guanina empleando 10-formilFH₄. El 5-metilFH₄ es un cofactor en la producción de metionina a partir de homocisteína, la metionina actúa directamente en la síntesis de proteínas o es transformada a SAM para la metilación de DNA y síntesis de poliaminas. La producción de poliaminas es uno de los primeros sucesos durante la proliferación celular antes de la síntesis de nucleótidos (Fernández, 1992; Faessel, 1998; Huang, 1999).

La deficiencia de folatos resulta en un daño general a la división y proliferación celular por alterarse su función en la síntesis de ácidos nucleicos provocando un retraso en la replicación; este retraso lleva a la incorporación de uracilo al DNA que promueve la inestabilidad genómica.

Además, el incremento de la homocisteína produce daño celular y tiene un efecto neurotóxico directo, pero el mecanismo teratogénico no está bien establecido. La homocisteína induce desarrollo fetal anormal involucrando un sitio de unión en la N-metil-D-aspartato en el receptor de glutamato, una variedad de los canales excitatorios

conductores de calcio, implicado en el desarrollo y migración neuronal. La embriotoxicidad de la homocisteína se ha atribuido a la inhibición de la metilación; sus ligandos tienen alta afinidad a las metiltransferasas celulares generando inhibición de productos para la enzima que resultan en una reducción de la metilación del DNA Y RNA (Lipton, 1997; Rosenquist, 1999).

7.2. ALTERACIONES MATERNAS

Los teratógenos, como la deficiencia de folatos, producen alteraciones a diferentes niveles tanto en la madre como en el producto de la gestación y subsecuentemente pueden generar alteraciones maternas y/o malformaciones (Czeizel, 1992; Czeizel, 1995).

Entre las características observadas en la toxicidad materna están las modificaciones en el peso corporal, consumo de alimentos, toxicidad en órganos específicos, alteraciones hematológicas o hallazgos patológicos. Estudios experimentales durante la organogénesis (6-15° día) en animales de laboratorio han establecido como baja toxicidad materna la disminución del peso corporal entre un 10 a 20% o un importante y prolongado decremento del consumo de alimentos. La toxicidad generalizada es determinada por una pérdida importante del peso corporal de los animales gestantes; la toxicidad materna elevada depende de la especie, por ejemplo cuando los roedores pierden más del 20% del peso corporal (Pierre, 2000).

En nuestro estudio se encontró que los grupos experimentales muestran una ganancia de peso menor que la obtenida por el grupo control. El **grupo 3** (9° día) mostró una ganancia de peso materno de 56.30 % con respecto al obtenido por el grupo control, en el **grupo 4** (10° día) la ganancia fue de 53.32 % y en el **grupo 5** (día 12°) de 68.10 %. Observando en la Tabla 1 la columna de peso total ganando se observa que todos los grupos experimentales de acuerdo al día de inyección y la dosis administrada presentaron una ganancia menor del 80 % (< 94.43 g), incluso los **grupos 3 y 4** (días de inyección en el 9° y 10° día) a dosis de 0.25 y a 0.50 mg/kg tienen una ganancia menor al 50% (< 59.02 g). Estos hallazgos sugieren mayor susceptibilidad en los días 9° y 10° de gestación en la rata.

7.3. ANALISIS DE LA MUESTRA OBTENIDA

Son diversos los estudios donde se ha demostrado que el metotrexate produce como efecto la deficiencia de ácido fólico, al bloquear la enzima dihidrofolato reductasa encargada de producir la forma activa del ácido fólico, tanto en modelos animales como en el humano; además se han realizado estudios donde se cuantifica el estado del ácido fólico (grado de deficiencia) según la dosis administrada de metotrexate. Considerando este efecto, es conveniente especificar que asumimos que se produce este mismo resultado en nuestro estudio y por lo tanto nos referiremos a la deficiencia de ácido fólico en este estudio considerando que se produce como efecto secundario conocido del uso de Metotrexate, así mismo, asumimos que los efectos producidos en el modelo son debidos a la deficiencia de ácido fólico originada por el metotrexate (Grossie, 1982; Chabner, 1985; Hendel, 1985; Clark, 1992; Hornung, 2004).

La embriotoxicidad y fetotoxicidad son los efectos adversos durante la exposición prenatal a ciertos factores. Se manifiestan por anomalías estructurales, funcionales o manifestaciones postnatales. También se incluye muerte, malformación, variación, retraso en la osificación, peso corporal bajo y daño funcional perinatal.

Las muertes fetales pueden ser un signo de toxicidad materna, pero también podrán ocurrir relacionadas al teratógeno. Cuando hay toxicidad materna elevada se puede relacionar la muerte fetal como consecuencia de ésta, pero cuando el incremento de las muertes fetales o reabsorciones está relacionado a la dosis, este efecto puede imitar la toxicidad materna produciendo una aparente pérdida en el peso corporal (Pierre, 2000).

Considerando el aspecto de la toxicidad materna aparente, efecto que sucede en nuestro estudio, no podemos atribuir las muertes fetales secundarias a toxicidad materna, ni determinar la existencia de toxicidad materna basándonos en la pérdida de peso, ya que no encontramos pérdida de peso con respecto al peso basal de las ratas madre y el déficit en la ganancia de peso está relacionado principalmente con el aumento de reabsorciones y en menor grado con el número de muertes fetales de acuerdo con el día de inyección y concentración de la dosis administrada de metotrexate. Muy probablemente la deficiente ganancia de peso materno esté determinada por las muertes fetales y reabsorciones causadas por el efecto embrio y fetotóxico de la deficiencia de folatos causada por el

metotrexate y no por la toxicidad materna. Sin embargo no podemos descartar la toxicidad materna ya que el 20% de las ratas gestantes presentó otras alteraciones maternas, como hemorragia uterina.

Podemos observar claramente el efecto tóxico de la deficiencia del ácido fólico inducido por el metotrexate basándonos en el número obtenido de fetos vivos, fetos muertos, fetos anormales y reabsorciones. Es evidente el efecto embrio y fetotóxico de la deficiencia de ácido fólico, principalmente durante los días 9° y 10° (**grupos 3 y 4**) y a dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg, lo que sugiere que estos días en el desarrollo en la rata presentan mayor susceptibilidad a la deficiencia de ácido fólico. En estos grupos y a estas dosis podemos observar diferencias significativas en el número de fetos vivos, fetos normales y reabsorciones. Incluso se observa una importante relación inversa entre la deficiencia de folato producida por el metotrexate con el número de fetos vivos obtenidos y fetos normales: a mayor dosis de metotrexate menor número de fetos vivos y normales; mientras que para las reabsorciones hay una importante relación positiva con la dosis de metotrexate: a mayor dosis de metotrexate mayor número de reabsorciones. Asimismo, existe una relación inversa no menos importante del número de fetos anormales con el día de inyección. Con los datos obtenidos es notorio que el grado de deficiencia de folatos inducido por el metotrexate de acuerdo a la dosis administrada es determinante en la aparición de toxicidad embrionaria y fetal y que aunado a los días críticos en el desarrollo prenatal confiere de mayor susceptibilidad al efecto teratogénico de la deficiencia del ácido fólico.

7.4. ALTERACIONES FETALES

Se ha mostrado que la L-homocisteina es embriotóxica en embriones de rata en cultivo, probablemente la toxicidad de la homocisteina se debe a una inhibición en las reacciones de metilación, incrementando los niveles de S-adenosilhomocisteina. Pero la vitamina B₁₂ bloquea completamente la toxicidad de L-homocisteina y el N⁵-metilFH₄, L-serina y L-metionina disminuyen la embriotoxicidad de la L-homocisteina en embriones de rata en el día 10 (Vanaerts, 1994), día que también en nuestro estudio hemos observado con importante susceptibilidad.

La experimentación de la deficiencia de ácido fólico con metotrexate muestra que el déficit producido es embriotóxico y teratogénico, pero se observa una gama de alteraciones, probablemente debido a una sensibilidad diferencial de los tejidos o una exposición variable en el embrión durante diferentes períodos sensibles (Brewton, 1990; PLM, 1999; Katzung, 1994).

7.4.1. Peso y talla

Nuestro estudio muestra una diferencia importante en el peso y en la talla en los grupos experimentales a dosis de 0.5 mg/kg de metotrexate, especialmente en el **grupo 3** (9° día de inyección) en comparación con los grupos que no recibieron inhibidor del ácido fólico. Sin embargo, el grupo control no muestra diferencia en el peso y la talla con los grupos experimentales, en contraposición a lo que sucede con el grupo de inyección salina que sí muestra diferencia con los grupos experimentales; cabe mencionar un aspecto importante referente a este dilema: el número de fetos obtenidos en el grupo de inyección salina fue menor al obtenido en el grupo control, lo que posiblemente le permitió a los fetos contar con mayor espacio y aporte de nutrientes y por lo tanto obtener mayor peso y talla. En el caso de los grupos experimentales se reduce importantemente el número de fetos y por lo tanto les permite contar con las ventajas mencionadas y que puedan obtener un peso cercano al del grupo control, además sin considerar que existe un aumento de peso por edema en el 6% de la muestra. Si contemplamos estos aspectos podríamos considerar al peso y la talla de los grupos experimentales como disminuido en comparación al grupo control y con el de inyección salina. Esto nos permite señalar la embrio y fetotoxicidad de la deficiencia del ácido fólico por metotrexate.

7.4.2. Alteraciones externas y malformaciones

Cuando se observan malformaciones relacionadas a la dosis, el efecto de toxicidad embrio-fetal puede ser considerado como efecto del teratógeno independientemente de la presencia o el grado de toxicidad materna. Las malformaciones se definen como alteraciones morfológicas irreversibles que afectan un órgano, parte del cuerpo o su totalidad y ocurren

por un evento adverso durante el desarrollo intrauterino (Pierre, 2000). Las malformaciones menores o anomalías son aquellas alteraciones que no afectan la salud del individuo.

Son múltiples los factores teratogénicos y la alimentación puede ser uno de ellos, debido a que la deficiencia o sobredosis de micro-nutrientes puede originar malformaciones congénitas. La importancia que ha adquirido el uso del ácido fólico como suplemento durante el periodo perinatal, es debido a que durante varios años se han realizado estudios observacionales que han identificado un aumento en el riesgo de malformaciones con el uso de antagonistas del ácido fólico, y contrariamente con la administración de ácido fólico se demuestra una reducción notable en el riesgo de malformaciones, específicamente de defectos del tubo neural y más recientemente de hendiduras faciales, estenosis pilórica hipertrófica, defectos del aparato urinario, extremidades y defectos cardiovasculares. La suplementación lo que hace es corregir la falta de folatos disponibles para la síntesis de ADN y ARN (Achon, 1999; Ruiz, 1996; Rose y Mennuti, 1995; Hernández, 2000; Hall y Solehdin, 1998, Czeizel 1995).

Aún cuando se cuenta con estudios observacionales realizados en mujeres en los que se investiga la relación entre la suplementación con multivitamínicos y disminución en el riesgo de malformaciones congénitas, los resultados han sido controvertidos y no son siempre constantes. Werler (1999) mostró que existía una notable reducción en el riesgo para paladar hendido, defectos en las extremidades y del tracto urinario, pero ninguna para cardiopatías. Czeizel (1993, 1995, 1996) encontró que hay una disminución en el riesgo de malformaciones congénitas (en conjunto), debida principalmente a la disminución del riesgo para defectos en las extremidades, sistema urinario y cardiovasculares en mujeres con suplementación previa a la concepción, pero por separado cada una de las entidades nosológicas no muestran disminución del riesgo. Se reportó en una población húngara que altas dosis de folatos (3-6 mg/d) disminuye 19% el riesgo para labio hendido y/o paladar hendido y para paladar hendido posterior hasta un 26% (Moyers, 2001).

Los homocigotos de la mutación MTHFR C677T presentan 3 veces más prevalencia de labio hendido. Además se ha observado un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas, principalmente cardiopatías, hendiduras orales y defectos urinarios con el uso de antagonistas del ácido fólico (TMP-SMX o antiepilépticos) durante el desarrollo

embrionario (Hernández, 2000). Con los hallazgos reportados el efecto teratogénico de la deficiencia y el efecto protector de la suplementación con folatos para otros defectos diferentes a los defectos del tubo neural es aún controversial.

La deficiencia de ácido fólico produce múltiples malformaciones congénitas en especies como el pollo y la rata. El metotrexate como causante de deficiencia de ácido fólico produce en el pollo labio y paladar hendido, osteoporosis, displasia de extremidades, sindactilia, aplasia digital, retraso de la osificación de la columna vertebral, esternón bífido y displasia de cráneo (Brewton, 1990). En estudios realizados en rata se ha reportado que la deficiencia de ácido fólico entre el día 10 a 21 produce edema, anemia, retardo en el desarrollo visceral, cataratas y múltiples anormalidades esqueléticas, tales como acortamiento de los huesos, retardo o ausencia de osificación, labio y/o paladar hendido, hendiduras faciales, mandíbula corta, curvatura de los huesos largos, fusión de falanges, anormalidades de la tibia, radio, esternón, escápula, deformidad de las patas, braquidactilia, sindactilia y retraso en el desarrollo (Willet, 1955; Nelson, 1955). La deficiencia producida en los días 11°-14° produjo una variedad de defectos esqueléticos congénitos principalmente en esternón, costillas y extremidades. También se observó cierto grado de dismorfismo, malformaciones en los núcleos de condensación mesenquimática y retardo en los centros de osificación; la deficiencia de folatos también provocó una alteración en el metabolismo del colágeno en las extremidades entre el día 16 y 18 (Schmidt, 1982). El retraso de la osificación puede ser un signo de retraso del crecimiento embrio-fetal y probablemente esté relacionado a la toxicidad materna, pero cuando no está asociada a toxicidad materna es un signo de embrio-fetotoxicidad (Pierre, 2000).

Aún cuando la deficiencia de ácido fólico producida en nuestro estudio no fue por un período prolongado obtuvimos un porcentaje importante de alteraciones externas (23% de la muestra). Las características externas fueron valoradas tomando como guía los rasgos externos analizados por Christie (1964). Es importante mencionar que se observó mayor afección en el **grupo 3** (9° día de inyección). Las alteraciones externas más frecuentes que observamos fueron el retraso del desarrollo intrauterino (12.5%), hipotrofia (8.2%), edema (6%), malformaciones (3.1%) y otras anormalidades como hematomas. Se observó mayor frecuencia (estadísticamente significativa) de fetos afectados con edema en el **grupo 3** (9° día de inyección), retraso del crecimiento en el **grupo 4 y 5** (10° y 12° día de inyección),

hipotrofia en el **grupo 5** (12° día de inyección) y en menor grado en el **grupo 4** (día 10° de inyección); se presentaron dos casos con hematoma en el **grupo 5** (12° día de inyección). Aun cuando no hay diferencias significativas de las malformaciones entre los grupos fue más frecuente en el **grupo 3** (9° día de inyección). Entre las malformaciones externas encontradas están las malformaciones de cabeza, principalmente en el **grupo 3** (9° día de inyección) consistentes en micrognatia, asimetría facial y deformidad craneal; las malformaciones de extremidades se presentaron en los **grupos 3 y 4** (9° y 10° día de inyección); y las malformaciones de cauda y columna fueron más frecuentes en el **grupo 4** (10° día de inyección); el único caso de defecto neural fue en el **grupo 3** (9° día de inyección).

Los hallazgos que obtuvimos coinciden con los reportados en estudios previos, principalmente la presencia de edema, retraso del crecimiento y malformaciones músculo-esqueléticas. Sin embargo, a diferencia de estudios previos en los que se ha observado una frecuencia importante de defectos del tubo neural, nosotros solo obtuvimos un caso de defecto del tubo neural, resultado que es posible obtener si consideramos otros factores. Se ha demostrado que las ratas alimentadas con dietas deficientes en ácido fólico, presentan una disminución de la concentración de esta vitamina en el hígado, riñón y bazo, pero no en el cerebro; en los tejidos con ácido fólico bajo, las cadenas de folatos son muy largas (hepta y octaglutamil), mientras que en el cerebro las cadenas permanecen normales (tetra y pentaglutamil), mecanismo que permite proteger al cerebro del déficit de folatos (Varela, 1992). Estos hallazgos nos permiten explicar porqué se observó una muy baja frecuencia de defectos del tubo neural. Debido a que la distribución y metabolismo de ácido fólico se afectan tardíamente en el cerebro y la deficiencia de ácido fólico producida por nosotros fue por corto tiempo e insuficiente para afectar los depósitos de ácido fólico en el sistema nervioso por una parte, y por otro lado, la deficiencia de ácido fólico se produjo en períodos en los que el cierre del tubo neural en la rata inició su cierre (9° día) o se ha completado (12° día), además estos estadios son críticos principalmente en el desarrollo de corazón.

Analizando los datos anteriores encontramos que las malformaciones son más frecuentes cuando la exposición al teratógeno es más temprana en el desarrollo, mientras que las anomalías son más frecuentes en periodos más tardíos de la organogénesis. La mayor susceptibilidad de la organogénesis en la rata es en los días 9° y 10°. En la deficiencia de

ácido fólico son frecuentes los defectos óseos, de extremidades y cabeza, como signos de embriotoxicidad temprana y el retraso del crecimiento intrauterino e hipotrofia como embriotoxicidad tardía y fetotoxicidad.

7.4.3. Alteraciones internas

También se ha observado en la rata, que la deficiencia de ácido fólico entre el día 9° a 13° y entre el día 9° al 21° del desarrollo produce hernia umbilical, gastrosquisis, hernia diafragmática y alteraciones genitourinarias que incluyen alteraciones en la posición renal, hidronefrosis o hidrouréter, hipoplasia renal, agenesia renal, criptorquidia o anomalía en la asociación del ovario con el riñón (Nelson, 1955).

Se encontró en nuestro estudio una diferencia significativa en la frecuencia de alteraciones internas, tanto por la dosis como por los días de inyección, en comparación al grupo control. En el **grupo 3** (9° día de inyección) el 34.5% de la muestra presentó alguna alteración interna, en el **grupo 4** (10° día de inyección) el 43.9% y en el **grupo 5** (12° día de inyección) el 27.6%. Las alteraciones internas observadas fueron: presencia de líquido peritoneal, líquido pleuropericárdico, hipoplasia pulmonar, falta de desarrollo pancreático y/o esplénico, criptorquidia, riñón ectópico y hemopericardio. Aun cuando se observaron mayor número de defectos en el **grupo 4** (10° día de inyección), es el **grupo 5** (12° día de inyección) el que muestra diferencia significativa. Los grupos significativamente afectados con líquido pleuropericárdico fueron los **grupos 3 y 4** (9° y 10° día de inyección). El caso de hemopericardio se presentó en el **grupo 5** (inyección en el día 12°). La hipoplasia pulmonar se presentó más frecuentemente en los **grupos 4 y 5** (10° y 12° día de inyección). Las alteraciones en las vísceras abdominales se presentaron principalmente en el **grupo 5** (12° día de inyección) y finalmente las genitourinarias en el **grupo 4** (10° día de inyección). En lo referente a las alteraciones internas, encontramos que los días más susceptibles a estas alteraciones fueron el 10° y 12° día.

7.4.4. Cardiopatías congénitas

Con la deficiencia de folatos además de aumentar el riesgo de fetos con bajo peso al nacer, retraso del crecimiento, alteraciones del desarrollo psicomotor, alteraciones hematológicas, malformaciones e hiperhomocisteinemia, se ha asociado a enfermedades cardiovasculares. Los suplementos disminuyen las malformaciones de los defectos del tubo neural, cardiovasculares, del aparato urinario, labio y paladar hendido u otras hendiduras faciales.

Nuestro estudio muestra que existe diferencia significativa en la frecuencia de cardiopatías congénitas en todos los grupos de inyección en comparación a la frecuencia del grupo control, tanto por el día de inyección como por la dosis administrada. El 16.2% de la muestra obtenida presentó alguna cardiopatía congénita. Con esta frecuencia podemos considerar que la deficiencia de ácido fólico inducida por metotrexate es un factor de riesgo importante, ya que la incidencia de cardiopatías es de 8:1000 nacidos vivos y nosotros hemos conseguido con esta exposición en la rata una **razón de 1:5**.

La comunicación interatrial fue la cardiopatía más frecuente, ocupó el 84.2% del total de las cardiopatías obtenidas en la muestra, esta cardiopatía se presentó principalmente en los días 10° y 12° de inyección (**grupos 4 y 5**); esta cardiopatía se correlacionó positivamente con la dosis. En el humano la comunicación interatrial ocupa el tercer lugar en frecuencia con el 7-15% del total de las cardiopatías aisladas, sólo por debajo de la persistencia del conducto arterioso y la comunicación interventricular. Tiene dos veces mayor preferencia en el sexo femenino (Attie et al., 1985; Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001). La clasificación de los defectos atriales es diversa, pero estos defectos se relacionan con los orificios y estructuras que aparecen durante la vida embrionaria. Por orden de frecuencia se presentan el foramen oval permeable, los defectos de la fosa oval, ostium secundum, seno coronario, ostium primum y finalmente el atrio común o único. Los defectos de la fosa oval o septum secundum pueden ser por la fenestración de la válvula, la ausencia parcial o total de la válvula o estar flotante. Se originan por desarrollo insuficiente del septum secundum o falla en la reabsorción del septum primum. El defecto central en la zona de la fosa oval, es la forma más frecuente de los defectos septales atriales (Espino-vela, 1988; Attie et al., 1985; Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001). El defecto tipo ostium primum se localiza en la parte baja del tabique, entre la fosa oval y la válvula tricúspide, cercano a los

cojines endocárdicos atrioventriculares, pero sin alteraciones del canal atrioventricular (Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001). El tipo de comunicación interatrial más frecuente en nuestro estudio fue el defecto central de la fosa oval u ostium secundum y sólo dos casos del tipo de ostium primum. No se observó preferencia por algún sexo.

La comunicación interventricular fue la segunda cardiopatía más frecuente y en la zona perimembranosa del tabique, con el 14% de las cardiopatías congénitas. Mostró correlación positiva con la dosis y el **grupo 3** (día 9° de inyección) presentó mayor diferencia entre los grupos. En el humano es la 2ª cardiopatía congénita aislada más frecuente, presentándose en uno de cada 3000 nacidos vivos y representa el 20% de los casos de cardiopatía. De acuerdo a la localización de la comunicación interventricular el 70% son perimembranosos y el 30% del septum muscular o apical. El 10% se acompaña de otras malformaciones cardíacas o es parte de un síndrome genético (Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001). La comunicación a nivel de la porción fibrosa es la más frecuente y se denomina comunicación interventricular perimembranosa. Se localiza entre la válvula tricúspide, la mitral y la aorta, pero puede extenderse a cualquiera de las regiones musculares. No se altera la circulación fetal con la comunicación interventricular (Attie et al., 1985; Attie et al., 1993).

Las anomalías de los vasos y alteraciones aórticas ocuparon el tercer lugar en nuestro estudio, cada una con el 8.8% del total de las cardiopatías congénitas, sin preferencia por algún sexo. Las alteraciones aórticas fueron estadísticamente diferentes en el **grupo 5** (inyección en el 12° día). Aun cuando por separado estas cardiopatías no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, sí son importantes, ya que si sumamos estas dos cardiopatías las diferencias son notables entre todos los grupos experimentales contra el grupo control. Las alteraciones aórticas encontradas fueron coartación aórtica, anillo aórtico y arco aórtico a la derecha.

La coartación aórtica es una de las cardiopatías vasculares más frecuentes en el hombre. Consiste en un estrechamiento del istmo de la aorta en la unión del cayado aórtico con la aorta descendente, en la unión del cuarto arco aórtico y la aorta dorsal. En los humanos ocupa el 5°-7° lugar entre todas las cardiopatías congénitas, se presenta en uno de cada 7000 nacidos vivos, corresponde al 6-8% de las cardiopatías y es responsable del 13-17%

de los fallecimientos por cardiopatía congénita. Es más frecuente en prematuros y hombres (Attie et al., 1985; Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001).

El anillo aórtico es una cardiopatía rara, debida a la persistencia del segmento del arco aórtico dorsal derecho, situado entre la salida de la arteria subclavia derecha y el punto en el que se une al arco aórtico izquierdo. El anillo vascular formado puede ser completo o parcial; los anillos completos rodean a la traquea y el esófago provocando una compresión en esta región manifestándose con disfagia y/o disnea. El anillo puede ser simétrico, pero en ocasiones cualquiera de las dos aortas dorsales experimenta una disminución del calibre o involución formando un anillo asimétrico (Attie et al., 1985; Carlson, 2005).

El arco aórtico derecho se produce por la persistencia del arco aórtico derecho y la desaparición del arco aórtico izquierdo desde la salida de la arteria subclavia izquierda hasta el segmento caudal donde se une con el arco aórtico derecho. Es una imagen en espejo del cayado aórtico y puede presentarse como anomalía aislada o en un situs inversus (Carlson, 2005).

La arteria subclavia derecha nace del cayado aórtico cuando la aorta dorsal derecha y el cuarto arco aórtico derecho degeneran entre la arteria carótida común y la inserción de la séptima arteria intersegmentaria torácica derecha (Attie et al., 1985; Carlson, 2005).

La tetralogía de Fallot la encontramos en el 1.8% del total de las cardiopatías congénitas. Se presentó en un feto del **grupo 4** (inyección en el 10° día). Esta cardiopatía en el hombre es la más frecuente de las cardiopatías congénitas cianóticas; se caracteriza por estenosis pulmonar infundibular, comunicación interventricular, aorta cabalgando ampliamente sobre el septum interventricular (aorta dextropuesta) e hipertrofia del ventrículo derecho. Se presenta en uno de cada 5 000 nacidos vivos, corresponde al 7% de las cardiopatías congénitas en los neonatos y el 10% en los niños mayores, representa el 9% de los casos de cianosis de origen cardíaco en los neonatos y después de la lactancia es la cardiopatía cianótica más común. Es ligeramente más frecuente en mujeres. El 15% se asocia a otras anomalías como comunicación interatrial, arco aórtico a la derecha, anomalías de las arterias coronarias (Attie et al., 1985; Espino-vela, 1988; Attie et al., 1993; Santamaría y Gómez, 2001). Esta patología se produce por una alteración en la tabicación del cono, originando una desviación anterior e izquierda del septum infundibular, lo cual produce la

estenosis infundibular pulmonar, la comunicación interventricular y el cabalgamiento aórtico. La comunicación interventricular generalmente es perimembranosa con extensión infundibular. La arteria pulmonar es de calibre reducido. Se puede asociar a comunicación interatrial, vena cava superior izquierda persistente y conexión anómala de venas pulmonares. En la etapa fetal no produce alteraciones hemodinámicas importantes, ya que la aorta lleva un gasto cardiaco aumentado y el conducto arterioso es de menor tamaño por un flujo disminuido, pero las cavidades se desarrollan normalmente (Attie et al., 1985; Espino-vela, 1988; Attie et al., 1993).

La tetralogía de Fallot, las alteraciones aórticas y las alteraciones de los vasos sanguíneos, que hemos descrito previamente, como son la arteria subclavia ausente, rama única bifurcada de la arteria pulmonar, estenosis de la arteria pulmonar, cayado aórtico derecho o en anillo, son producidas por alteraciones en el desarrollo de los arcos aórticos y tabicación cardiaca. No olvidemos que en el desarrollo normal de los arcos faríngeos y por lo tanto de los arcos aórtico, así como en la tabicación del tracto de salida del corazón, la migración de las células de las crestas neurales juegan un papel trascendental en el desarrollo de las estructuras originadas, y parte de las cardiopatías encontradas en este estudio están dentro del grupo de defectos cardiacos producidos por falla en la migración de las crestas neurales, por lo que con los hallazgos encontrados no podemos descartar que estas células o su migración se vea afectada, considerando además que otras estructuras craneales y faciales también se encontraron afectadas en nuestro estudio.

Estudios de casos y controles en humanos, en los que la madre reporta la ingesta de suplementos multivitamínicos de ácido fólico de 1 a 3 meses antes y 3 meses durante la gestación, han mostrado una disminución del 40% en el riesgo de malformaciones cardiacas; la disminución del riesgo es mayor en los defectos del tracto de salida (cono-truncuales) y en los defectos septales ventriculares. Este efecto no es observado cuando se inicia la ingesta de multivitamínicos después del primer mes de embarazo (Botto, 1996; Shaw, 1998; Botto, 2000a). Estos autores sugieren que se podrían prevenir 1 de cada 4 cardiopatías mayores con suplementos vitamínicos (Botto, 2000a).

La ingesta de multivitamínicos con ácido fólico entre 250-400 $\mu\text{g}/\text{d}$ se reporta inversamente relacionada al riesgo de malformaciones cardiacas del tracto de salida, principalmente para

la transposición de las grandes arterias donde el riesgo estimado disminuye hasta un 60 %; el efecto es menor en la tetralogía de Fallot, sin embargo, el efecto protector es variable según el tipo de malformación, haciendo controversial los resultados por la dificultad de seleccionar y delimitar los casos, sumado a estudios que no encuentran asociación (Botto, 1996; Shaw, 1998; Scalón, 1996; Werler, 1999).

Se ha observado hiperhomocisteinemia en madres con hijos con cardiopatías, por lo que la hiperhomocisteinemia podría ser un factor de riesgo para cardiopatías (Kapusta, 1999). Parece que la patogénesis involucra a las células de la cresta neural. Estudios experimentales en aves han registrado que las concentraciones elevadas de homocisteína originan defectos en la inducción de las células de la cresta neural, defectos del tubo neural, faciales y alteraciones en la septación cardiaca (ventricular), debido a que actúa como antagonista del receptor de N-metil-D aspartato por inhibición competitiva (Rosenquist 1996; Rosenquist 1999).

Por otro lado, se ha observado en estudios experimentales que la deficiencia de ácido fólico produce alteraciones en la multiplicación celular principalmente durante los periodos de mayor proliferación o en tejidos de proliferación rápida, como en el paladar de embriones, en el intestino y/o colon (DePaola, Mandella, 1989; Gibson, 2005). Además se ha estudiado que el metotrexate produce apoptosis en células hematopoyéticas e intestino. Incluso se ha mostrado que la deficiencia de ácido fólico por si misma induce apoptosis en diversos tejidos como linfocitos, trofoblasto, células endoteliales de la vena umbilical, entre otros (Chern, 2001; Li, 2003; DiSimone, 2004; Wang, 2004; Gibson, 2005; Herman, 2005).

Por ello no debemos descartar que la deficiencia de ácido fólico produzca lesión en células diferentes a las crestas neurales, puesto que otro porcentaje de las cardiopatías que obtuvimos en nuestro estudio, como son la comunicación interatrial y los defectos del sistema venoso no se explican por este mecanismo. Por lo tanto, debemos considerar otros mecanismos también importantes en la patogenia de las cardiopatías, como son la proliferación celular y la apoptosis, que se contemplan en este estudio por el hecho de que la deficiencia del ácido fólico produce alteraciones en la proliferación de células, tales como los mioblastos y/o lleva a apoptosis por falla en la progresión de la fase "S" (Genestier, 1998; Huang, 1999).

7.5. Prevención del déficit de folatos y cardiopatías congénitas

Los efectos adversos de los teratógenos estudiados en una especie pueden ser extrapolados a otras especies aún cuando éstas no muestren el mismo patrón de efectos teratogénicos debido a sus diferencias metabólicas. Estas variaciones no excluyen la posibilidad de que se presente dicho efecto en el desarrollo de especies distintas, incluyendo el humano. Cuando una especie animal presenta un efecto adverso en el desarrollo existe la presencia de un efecto adverso potencial en el desarrollo humano. La extrapolación del efecto tóxico en los animales al humano puede tomar mayor importancia si se reproduce el mismo patrón del efecto teratogénico principalmente si el efecto está relacionando a la dosis, afecta vías metabólicas comunes o por la severidad de las malformaciones, entre otras (Pierre, 2000).

Por lo que debemos considerar que en nuestra población existen una serie de factores estudiados experimentalmente que aumentan el riesgo de malformaciones y ahora de cardiopatías congénitas (primera causa de morbi-mortalidad infantil en México), como son que la deficiencia de ácido fólico origina hiperhomocisteinemia y ésta a su vez es teratogénica, la fuerte asociación de la homocigosis para la mutación C677T con hiperhomocisteinemia y bajo estatus de folatos, elevada prevalencia de esta mutación en nuestra población, la prevalencia elevada de anemia en el país (el 27.8% en las mujeres embarazadas y 20.8% en las mujeres no embarazadas en edad fértil) con mayor prevalencia en las zonas rurales que en las urbanas (Moyers y Bailey, 2001; Guinotte, 2003; Shamah, 2003) y que el 28% de las mujeres en la Ciudad de México y el 5% de la población general de mujeres en edad fértil en México presentan deficiencia de folatos y sin diferencia entre las mujeres de zona rural o urbana, pero con más prevalencia en el norte y sur que en el centro y la Ciudad de México, mientras que la prevalencia de la anemia es mayor en la región sur, seguida del norte, centro, en la Ciudad de México. La población indígena presenta mayor prevalencia que la no indígena (Casanueva, 2000; Villalpando, 2003; Shamah, 2003).

Se recomienda el uso de suplementos con ácido fólico antes de la cuarta semana de gestación e idealmente dos meses previos a la concepción, pero en México la mayoría de los embarazos no son planificados y las mujeres no se dan cuenta del embarazo en sus primeras etapas y la suplementación otorgada por los servicios de salud en la atención posterior al diagnóstico de embarazo ya no confiere el efecto protector. Por lo que una de

las estrategias razonables para la suplementación temprana es la fortificación de los alimentos con ácido fólico, además de enfatizar y fomentar la importancia de su consumo en las mujeres en edad fértil como prevención de las malformaciones congénitas.

La homocisteína altera la capacidad vasodilatadora del endotelio, produciéndole daño y disfunción por los radicales libres generados; también inhiben crecimiento de las células endoteliales y promueve la trombosis generando lesión vascular. Si consideramos que las malformaciones congénitas son la primera causa de muerte en los menores de un año y las enfermedades cardiovasculares son en el adulto la primera causa de mortalidad y que el ácido fólico juega un papel importante en la prevención de estas patologías entonces es de suma importancia difundir el uso del ácido fólico y establecer las estrategias para la suplementación en nuestra población que padece de gran número de factores de riesgo.

Se ha sugerido la fortificación de los alimentos como el cereal, la pasta y el arroz con ácido fólico, vitamina B₆ y B₁₂, para disminuir la presentación de malformaciones. Se ha observado en la población que recibe la fortificación un mejor estatus de ácido fólico y disminución de la concentración de homocisteína hasta en 50%, y por lo tanto disminuye el riesgo de defectos del tubo neural y otras malformaciones (Jacques, 1999), ahora incluidas las cardiopatías congénitas.

Si consideramos que las cardiopatías congénitas ocupan la primera causa de muerte en nuestro país y hemos observado que la deficiencia de ácido fólico es un factor de riesgo importante en el desarrollo de las cardiopatías congénitas entonces la fortificación de los alimentos con ácido fólico será una medida estratégica en la disminución de la incidencia de estas malformaciones y por lo tanto de la mortalidad infantil.

Czeizel (1995) refiere que el 60% de las malformaciones son prevenibles tomando las medidas higiénicas adecuadas. Por lo que en México además de la suplementación de los alimentos, la educación de los prestadores de salud y de las mujeres en edad reproductiva será muy importante y se tendrán que elaborar planes para que las mujeres planeen sus embarazos o en su defecto mantengan niveles elevados de ingesta de folatos.

Además este modelo experimental nos permitirá estudiar más detalles sobre el efecto de la deficiencia del ácido fólico durante la gestación y los mecanismos por los que se desarrollan todo este espectro de malformaciones.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El metotrexate es embrio y fetotóxico en la rata.
2. El periodo de mayor susceptibilidad en la rata a la toxicidad por deficiencia de ácido fólico inducida por metotrexate fue en los días 9° y 10° del desarrollo prenatal y a dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg de MTX.
3. La deficiencia de ácido fólico produjo baja natalidad y los productos obtenidos fueron hipotróficos en el 8.2% y/o con retraso del crecimiento intrauterino en el 12.5%. La mayor susceptibilidad de la organogénesis fue en los días 9° y 10°.
4. Así mismo, la deficiencia de folatos fue teratogénica. La mayor frecuencia de malformaciones fue en el 9° día. La frecuencia de malformaciones fue de 10.7%.
5. Las malformaciones obtenidas fueron de cabeza, extremidades, cauda, columna y un caso de defecto del tubo neural.
6. Las malformaciones fueron más frecuentes cuando la exposición a la deficiencia fue más temprana en el desarrollo, mientras que las anomalías fueron más frecuentes en periodos más tardíos de la organogénesis.
7. La mayor susceptibilidad para originar alteraciones internas por deficiencia de folatos fue en el 10° día con el 43.9%. Las alteraciones internas fueron líquido peritoneal y/o pleuropericárdico, hipoplasia pulmonar, falta de desarrollo pancreático y/o esplénico, criptorquidia, riñón ectópico y hemopericardio.
8. La deficiencia de ácido fólico es un factor de riesgos importante en el desarrollo de cardiopatías congénitas. La proporción obtenida de cardiopatías fue de 16% y una razón de 1 en 5.
9. La comunicación interatrial del tipo fosa oval fue la cardiopatía más frecuente, seguida de la comunicación interventricular, las alteraciones aórticas y vasculares ocuparon el tercer lugar.
10. Este estudio aporta un modelo útil para la experimentación de los mecanismos de lesión producidos por el déficit de folatos, tales como apoptosis, proliferación o migración de células de la cresta neural.
11. Aporta datos relevantes para justificar el desarrollo de programas para la suplementación masiva, especialmente en mujeres en edad fértil. De esta manera se podrá reducir la frecuencia de la primera causa de mortalidad infantil en México.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Achon M, Reyes L, Alonso-Apperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G. High dietary folate supplementation affects gestational development and dietary protein utilization in rats. *J Nutr* 1999; 129: 1204-1208.
2. Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4881-4885.
3. Amarante-Méndes G.P. Green D.R. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 1053-1061.
4. Arteaga M, García-Peláez I y Quero-Jiménez M. Desarrollo embriológico normal del corazón. En: Arduza Fernández, J. *Cardiología Pediátrica*. Madrid, España: Ed. CEA, S.A. (Grupo Jarpyo), 1987: 41 - 64.
5. Arteaga M, García-Peláez I, Cornejo LR, Chavira S, Saavedra D. Fetal dysmorphism in spontaneous abortions in a Mexican population. *Int J Gynecol Obstet* 2001; 73: 131-140.
6. Asako H, Wolf RE, Granger DN. Leukocyte adherence in rat mesenteric venules: effects of adenosine and methotrexate. *Gastroenterology* 1993; 104: 31-37.
7. Attie F, Muñoz L, Buendía A. Embriología cardiovascular. En: *Cardiopatías Congénitas. Morfología, Cuadro Clínico y Diagnóstico*. México, D.F. Salvat Mexicana de Ediciones S.A. de C.V. 1985.
8. Attie F, Zabal C, Buendía A. *Cardiología Pediátrica. Diagnóstico y Tratamiento*. México, D.F. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. 1993.
9. Baggott J. Differences in methotrexate and 7-hidroxymethotrexate inhibition of folate-dependent enzymes of purine nucleotide biosynthesis. *Biochem J* 1994; 300: 627-629.
10. Bailey L, Gregory J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and others enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999; 129: 919-922.
11. Bobadilla J. Estudio diagnóstico del recién nacido con sospecha de cardiopatía. *Rev Perinat* 1987; 2: 18-21.

12. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population-based, case-control study. *Pediatrics* 1996; 98: 911-917.
13. Botto LD, Mastroiacovo P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet* 1998; 53: 456-459.
14. Botto L, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000a; 151: 878-884.
15. Botto L, Yang Q. 5-10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000b; 151: 862-877.
16. Brewton R, McCabe J. Studies of methotrexate induced limb dysplasias utilizing a chromium release assay. *Teratology* 1990; 41: 211-221.
17. Carlson BM. Problemas del Desarrollo: Causas, mecanismos y patrones, crestas neurales, sistema cardiovascular. En: *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 2º ed. Madrid, España: Harcourt-Mosby, 2005: 132-149, 255-265, 397-441.
18. Casanueva E, Carsolio A, Garza-Chazaro MG, Pfeffer F. Deficiencia de hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂ en mujeres mexicanas urbanas en edad reproductiva. *Perinatol Reprod Hum* 2000; 14:192-196.
19. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, et. al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 1985; 76: 907-912.
20. Chen JN, Van Eeden FJ, Warren KS, et. al. Left-right pattern of cardiac BMP-4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* 1997; 124: 4373-4382.
21. Chern CL, Huang RF, Chen YH, Cheng JT, Liu TZ. Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 434-42.
22. Christie G. Developmental stages in somite and post-somite rat embryos, based on external appearance and including some features of the macroscopic development of oral cavity. *J Morph* 1964; 114: 263-286.
23. Clark WG, Brater DG, Johnson AR. *Goth Farmacología Médica*. Madrid, España: Mosby, 1992: 610-614.

24. Conn EE, Stumpf PK. *Bioquímica Fundamental*. 3° ed. México: Limusa, 1978: 253-258.
25. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins. Patología Estructural y Funcional*. 5° ed. España: McGraw-Hill Interamericana, 1996: 671, 673-674.
26. Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 1991; 88: 2441-2445.
27. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate. *J Clin Invest* 1993; 92: 2675-2682.
28. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Eng J Med* 1992; 327: 1832-1835.
29. Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BJM* 1993; 306: 1645-1648.
30. Czeizel AE. Nutritional supplementation and prevention of congenital abnormalities. *Curr Op Obst Gynecol* 1995; 7: 88-94.
31. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet* 1996; 62: 179-183.
32. De la Cruz MV, Sánchez C, Arteaga M, Argüello C. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat* 1977; 123: 661-686.
33. De la Cruz MV, Giménez-Ribotta M, Saravalli O, Cayre R. The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am J Anat*. 1983; 166: 63-72.
35. De la Cruz MV, Markwald RR, Krug EL, Rumenoff L, Sánchez C, et. al. Living morphogenesis of the ventricles and congenital pathology of their component parts. *Cardiol Young* 2001; 11: 588-600.
36. DePaola DP, Mandella RD. Folate deficiency and in vitro palatogenesis II: Effects of methotrexate on rabbit palate fusion, folate pools, and dihydrofolate reductase activity. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1984; 4:321-7.

37. Devlin T.M. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 2° ed. España; Reverté S.A., 1991: 1245-1250.
38. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 45° ed. México: PLM S.A. de C.V. 1999: 1259-1264, 2085.
39. Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud. Estadísticas vitales en niños y adolescentes mexicanos. Mortalidad perinatal. México. Bol Med Hosp Inf Mex 2004a; 61: 442-455.
40. Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud. Estadísticas vitales en niños y adolescentes mexicanos. Mortalidad infantil. México. Bol Med Hosp Inf Mex 2004b; 61: 515-527.
41. DiSimone N, Riccardi P, Maggiano N, et. al. Effect of folic acid on homocysteine-induced trophoblast apoptosis. Mol Hum Reprod 2004; 10: 665-669.
42. Dudman NPB, Slowiaczek P, Tattersall MHN. Methotrexate rescue by 5-methyltetrahydrofolate or 5-formyltetrahydrofolate in lymphoblast cell-lines. Cancer Res 1982; 42: 502-507.
43. Elmazar M, Nau H. Methotrexate increases valproic acid-induced developmental toxicity, in particular neural tube defects in mice. Teratog Carcinog Mutagen 1992; 12: 203-210.
44. Erickson JD. Risk factors for birth defect: data from the Atlanta birth defects case-control study. Teratology 1991; 43: 41-51.
45. Espino-Vela J. Etiología y Epidemiología. En: Cardiología Pediátrica. 2° ed. México, D.F. Méndez Oteo, 1988.
46. Fabre I, Fabre G, Goldman D. Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. Cancer Res 1984; 44: 3190-3195.
47. Faessel HM, Slocum HK, Jackson RC, et. al. Super in vitro synergy between inhibitors of dihydrofolate reductase and inhibitors of other folate-requiring enzymes: The critical role of polyglutamimation. Cancer Res 1998; 58: 3036-3050.
48. Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, et. al. Harrison. Principios de Medicina Interna. 14° ed. México, D.F. McGraw-Hill Interamericana, 1998: 750.

49. Fernández-Tresguerres JA. Fisiología Humana. Madrid, España. Interamericana-McGraw Hill, 1992: 383-384.
50. Ferrán M. SPSS para windows. Análisis estadístico. España: McGraw Hill; 2001: 1-95, 139-165.
51. Fisher S, Langille B, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res* 2000; 87: 856-864.
52. Fishman M, Chien K. Fashioning the vertebrate heart earliest embryonic decision. *Development* 1997; 124: 2099-2117.
53. Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Folate depletion induced by methotrexate affects methionine synthase activity and its susceptibility to inactivation by nitrous oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1305-1311.
54. Fleming A, Copp AJ. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 1998; 280: 2107-09.
55. Fukiishi Y, Morriss-Kay GM. Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos. *Cell Tiss Res* 1992; 268: 1-8.
56. García-Peláez I, Díaz-Góngora G, Arteaga-Martínez M. Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. *Acta Anat* 1984; 118: 224-230.
57. García-Peláez I, Arteaga M. Experimental study of the development of the truncus of the chick embryo heart. *Anat Rec* 1993; 237: 378-384.
58. Genestier L, Paillot R, Fournel S, et al. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 322-328.
59. Gibson RJ, Bowen JM, Cummins AG, Keefe DM. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. *Clin Exp Med* 2005; 4: 188-95.
60. Goldman ID. Transport energetics of the folic acid analogue, methotrexate, in L1210 leukemia cells. *J Biol Chem* 1969; 244: 3779-3785.
61. Grossie VB, Ho DHW, Ti li Loo. Effect of malnutrition on methotrexate toxicity and tissue levels of dihydrofolate reductase in the rat. *Cancer Treat Rep* 1982; 66: 85-89.

62. Guinotte Ch, Burns MG, Axume J, et. al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant modulates folate status response to controlled folate intakes in young women. *J Nutr* 2003; 133: 1272-80.
63. Guizar J. *Genética Clínica. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias*. 2° ed. México, D.F. Manual Moderno, 1994: 130-135, 207.
64. Haig MM, Wang YM, Daly JM. Effects of nutritional depletion and repletion on plasma methotrexate pharmacokinetics. *Cancer* 1984; 54: 2268-2271.
65. Hall J, Solehdin F. Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 445-450.
66. Hasson SR, Mezey E, Hoffman BJ. Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neuroscience* 1999; 89: 243-265.
67. Hendel J, Poulsen H, Nyfors B, Nyfors A. Changes in liver histology during methotrexate therapy of psoriasis correlated to the concentration of methotrexate and folate in erythrocytes. *Acta Pharmacol Toxicol* 1985; 56: 321-326.
68. Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* 2005; 54: 273-280.
69. Hernández S, Werler M, Walker A, Mitchell A. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000; 343: 1608-1614.
70. Hornung N, Ellingsen T, Stengaard-Pedersen K, Poulsen JH. Folate, homocysteine, and cobalamin status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate, and the effect of low dose folic acid supplement. *J Rheumatol* 2004; 31: 2374-2381.
71. Huang RFS, Ho YH, Lin HL, et al. Folate deficiency induces a cell cycle-specific apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr* 1999; 129: 25-31.
72. Hyett J, Moscoso G, Nicolaidis K. Morphometric analysis of the great vessels in early fetal life. *Human Reprod* 1995; 10: 3045-3048.
73. Jacob RA, Jenden DJ, Allman-Farinelli A, Swendseid MA. Folate nutriture alters choline status of women and men fed low choline diets. *J Nutr* 1999; 129: 712-717.

74. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et. al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-9.
75. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, et. al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Eng J Med* 1999; 340: 1449-1454.
76. Johanning G, Tamura T, Johnston K, Wenstrom K. Comorbidity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 2000; 37: 949-951.
77. Jolivet J, Chabner BA. Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. *J Clin Invest* 1983a; 72: 773-778.
78. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, et. al. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Eng J Med* 1983b; 309: 1094-1104.
79. Kapusta L, Haagmans M, Steegers E, et. al. Congenital heart defect and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediat* 1999; 135: 773-774.
80. Katzung BG. *Farmacología Básica y Clínica*. 5° ed. México, D.F.: Manual Moderno, 1994: 976-977.
81. Kauwell GPA, Wilsky CE, Cerda JJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C→T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism* 2000; 49: 1440-1443.
82. Kirby ML, Waldo KL. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 1995; 77: 211-215.
83. Kirke P, Mills J, Whitehead A, et. al. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348: 1037-1038.
84. Kluijtmans LAJ, Kastelein JJP, Lindemans J. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 2573-2577.
85. Koide Y, Aoki T, Hreshchyshyn MM. Effects of hormones, methotrexate and dactinomycin on benign trophoblast. *Am J Obstet Gynec* 1971; 109: 453-456.
86. Kröger H, Dietrich A, Grätz R, et. al. The effect of tryptophan plus methionine, 5-azacytidine and methotrexate on adjuvant arthritis of rat. *Gen Pharmacol* 1999; 33: 195-201.

87. Li GM, Presnell SR, Gu L. Folate deficiency, mismatch repair-dependent apoptosis, and human disease. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 568-575.
88. Lipton S, Kim W, Choi Y, et. al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5923-5928.
89. Martínez L, Delgado I, Valdéz R, et. al. Folate levels and N⁵N¹⁰Methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 2001; 32: 277-282.
90. Méndez J, Inocencio NF. La deficiencia del ácido fólico y los defectos del tubo neural alcanzan proporciones alarmantes en México. Fascículo 1. México: YJP, 2005.
91. Mills J, McPartlin J, Kirke P, et. al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345: 149-151.
92. Mohillo AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, et. al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349: 1591-1593.
93. Moore KL, Persaud TVN. Introducción a la embriología. Causas de las malformaciones congénitas. En: *Embriología Clínica*. 4° ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 2004: 1-14, 144-174.
94. Morabito L, Montesinos MC, et. al. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires Ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1998; 101: 295-300.
95. Moyers S, Bailey L. Fetal malformations and folate metabolism: Review of recent evidence. *Nut Rev* 2001; 59: 215-235.
96. Mutchinick O, Lisker R, Babinski V. Programa Mexicano de "Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas". *Sal Pub Mex* 1988; 30: 88-100.
97. Mutchinick O. II Epidemiología de las Malformaciones Congénitas. *Gac Méd Mex* 1996; 131: 152-160.

98. Nelson M, Wright H, Willet C, Evans H. Multiple congenital abnormalities resulting from transitory deficiency of pteroylglutamic acid during gestation in the rats. *J Nutr* 1955; 56: 349-369.
99. Nora J, Berg K, Nora A. Cardiovascular disease. Genetic, Epidemiology and Prevention. New York, USA: Oxford University Press, Inc., 1991.
100. Okuda A, Kubota M, Sawada M, et. al. Methotrexate inhibits superoxide production and chemotaxis in neutrophils activated by granulocyte colony-stimulating factor. *J Cell Physiol* 1996; 168: 183-187.
101. Ortiz M, Flores G, Cardiel L, Luna C. Frecuencia de malformaciones congénitas en el área de neonatología del Hospital General de México. *Rev Mex Ped* 2003; 70: 128-131.
102. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, et. al. 5-10metylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996; 63: 610-614.
103. Pierre, Eléfant E, Saint-Salvi B. Hierarchization of animal teratology findings for improving the human risk evaluation of drugs. *Reprod Toxicol* 2000;14: 369-375.
104. Quero-Jiménez M. Ten common congenital cardiac defects. Diagnosis and management. *Paediatrician* 1981; 10: 3-45.
105. Ramírez JA, Benavides FG, Lacasaña M, Martínez JM, et. al. Mortalidad por defectos del tubo neural en México, 1980-1997. *Sal Pub Mex* 2003; 45: 356-364.
106. Rhee M, Galivan J. Conversion of methotrexate to 7-hydroxymethotrexate and 7-hydroxymethotrexate polyglutamates in cultured rat hepatic cells. *Cancer Res* 1986; 46: 3793-3797.
107. Rose N, Mennuti M. Periconceptional folic acid supplementation as a social intervention. *Sem Perinat* 1995; 19: 243-254.
108. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 15227-15232.
109. Rosenquist TH, Schneider AM, Monaghan DT. N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *The FASEB J* 1999; 13: 1523-1531.

110. Ruiz C, Fernández G, Luna P, Tapia R. Panorama epidemiológico de los defectos del tubo neural en México. *Gac Med Mex* 1996; 131: 485-489.
111. Sadler TW. *Langman Embriología Médica con orientación Clínica*. 9° ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2004.
112. Sánchez P. *Cardiología Pediátrica. Clínica y Cirugía*. Tomo 1. Barcelona, España: Salvat, 1986: 4-5.
113. Sand PK, Stubblefield PA, Ory SJ. Methotrexate inhibition of normal trophoblast in vitro. *Am J Obstet Gynec* 1986; 155: 324-329.
114. Santamaría-Díaz H, Gómez-Gómez M. *Cardiología neonatal*. México: DEM S.A. de C.V., 2001: 55-124.
115. Scanlon KS, Ferencz C, Loffredo CF, et. al. Preconceptional folate intake and malformations of the cardiac outflow tract. *Epidemiology* 1996; 98: 95-98.
116. Schilsky RL, Bailey BD, Chabner BA. Methotrexate polyglutamate synthesis by cultured human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2919-2922.
117. Schilsky RL, Bailey BD, Chabner BA. Characteristics of membrane transport of methotrexate by cultured human breast cancer cells. *Bioch Pharmacol* 1981; 30: 1537-1542.
118. Schmidt RR, Abbott PK, Cotler JM. 9-methylpteroylglutamic acid, a synthetic analogue of folic acid: its effects on hexosamine levels in fetal rat limbs and other fetal tissues. *Biol Neonate* 1982; 41: 52-56.
119. Shamah T, Villalpando S, Rivera J, et al. Anemia in Mexican women: a public health problem. *Sal Pub Mex* 2003; 45: S499-S507.
120. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman R, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 30-37.
121. Shields D, Kirke P, Mills J, et. al. The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Gen* 1999; 64: 1045-55.

122. Sirotnak FM, Moccio DM. Pharmacokinetic basis for differences in methotrexate sensitivity of normal proliferative tissues in the mouse. *Cancer Res* 1980; 40: 1230-1234.
123. Sissman N. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. *Am J Cardiol* 1970; 25: 141-148.
124. Steegers RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, et. al. Maternal hiperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects?. *Metabolism* 1994; 43: 1475-1480.
125. Stromhaug A, Slordal L, Warren DJ. Differential effects of the antifolates methotrexate, aminopterin and trimetrexate on murine haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 1996; 92: 514-520.
126. Stryer L. *Bioquímica*. 3° ed. España: Reverté, 1990: 586-590, 789-790, 619-622.
127. Thompson M, McInnes R, Willard H. *Genética en Medicina*. 4° ed. Barcelona, España: MASSON, 1996.
128. Vanaerts L, Blom H, Deabreu R, et. al. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 1994; 50: 348-360.
129. Van der Put N, Gabreëls F, Stevens E, et. al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects?. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-1051.
130. Van Praagh R, Takao A, Asami I. Partitioning of the arterial end of the embryonic heart. En: *Etiology and morphogenesis of congenital heart disease*. New York: Futura Publishing company, 1980: 51-61.
131. Varela-Moreiras G, Selhub J. Long term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *J nutr* 1992; 122: 986-991.
132. Vega A, Vizzuett R. Frecuencia de malformaciones congénitas en un hospital general de tercer nivel. *Rev Mex Ped* 2005; 72: 70-73.
133. Villalpando S, Montalvo I, Zambrano N, et. al. Vitamins A, and C and folate status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years: a probabilistic national survey. *Sal Pub Mex* 2003; 45: S508-S519.

134. Wang Y, Zhou Q, Wang S, Zhang J. Homocysteine-induced apoptosis of endothelial cell and its antagonism by folic acid--the roles of caspase3, c-IAP1 and c-IAP2. *Wei Sheng Yan Jiu* 2004; 33: 310-313.
135. Warren RD, Nichols AP, Bender RA. Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res* 1978; 38: 668-671.
136. Wenstrom K, Johanning G, Johnston K, DuBard M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 806-817.
137. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 675-682.
138. Willet C, Nelson M, Wright H, Evans H. Congenital eskeletal abnormalities in fetal rats resulting from maternal pteroylglutamic acid deficiency during gestation. *Anat Rec* 1955; 121: 775-799.
139. Yost HJ. The genetics of midline and cardiac laterality defects. *Current Opinion in Cardiol* 1998; 13: 185-189.
140. Zhao R, Gao F, Goldman D. Discrimination among reduced folates and methotrexate as transport substrates by a phenylalanine substitution for serine within the predicted eighth transmembrane domain of the reduced folate carrier. *Bioch Pharmacol* 1999; 58: 1615-1624.

ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "DR. FEDERICO GOMEZ"
DEPTO. BIOLOGIA DEL DESARROLLO y TERATOGENESIS EXPERIMENTAL
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROTOCOLO
**EFFECTO TERATOGENICO DE LA DEFICIENCIA DE ACIDO FOLICO
INDUCIDA POR METOTREXATE EN EL DESARROLLO DE CORAZON.
MODELO EXPERIMENTAL EN LA RATA.**

Rata No: Peso inicial: Frasco No:
Grupo de asignación: Fecha de recepción:
Días de control pretratamiento:
Características ciclo estral:
Fecha inicio de la gestación: Fecha inicio del tratamiento:

INCREMENTO PONDERAL DE LA RATA DURANTE LA GESTACION

	Día	Fecha	Peso
Inicio de la gestación	0		
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
1° dosis	9		
	10		
	11		
	12		
	13		
	14		
	15		
	16		
	17		
	18		
	19		
	20		
Cesárea	21		

Observaciones durante el tratamiento:

