

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ALTERACIÓN DEL DESARROLLO TEMPRANO DEL  
SISTEMA NERVIOSO DE EMBRIONES DE POLLO POR  
EFECTO DE LA FENITOÍNA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**DIANA MARÍA ASTORGA ONTIVEROS**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

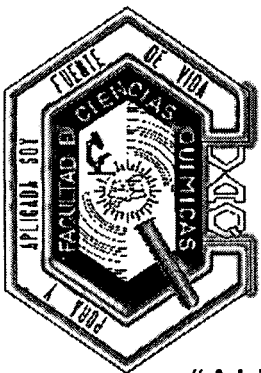
No. Adq. H59036

Class TS

619.5

A858a

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



## FACULTAD DE QUÍMICA

“ALTERACIÓN DEL DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO DE EMBRIONES DE POLLO POR EFECTO DE LA FENITOÍNA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DIANA MARÍA ASTORGA ONTIVEROS

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCIA ALCOCER. \_\_\_\_\_  
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA \_\_\_\_\_  
SINODAL

Q.B. JUANA SUSANA FLORES ROBLES \_\_\_\_\_  
SINODAL

Q.F.B. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIERREZ \_\_\_\_\_  
SINODAL

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	2
I.1. Farmacología y Farmacocinética	5
I.2. Desarrollo del Sistema Nervioso	17
I.3. Expresión Génica	21
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVOS	27
III.1 General	27
III.2 Específicos	27
IV. METODOLOGÍA	28
IV.1 Materiales	28
IV.2 Métodos	28
IV.3 Diseño Experimental	29
IV.4 Método Estadístico	29
V. RESULTADOS	32
VI. DISCUSIÓN	39
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la Fenitoína	5
2	Superficie Dorsal del Disco Embrionario	19
3	Formación del Tubo Neural	20
4	Regulación Molecular de la Formación de la Médula Espinal	22
5	Grafica de Embriones Normales	32
6	Embrión normal de ED 13 (25X)	33
7	Grafica de Aplasia.	34
8	Aplasia Generalizada	34
9	Grafica de Resorciones	35
10	Resorción	36
11	Grafica de Anormalidades más Resorciones	37
12	Grafica de Relación Dosis-Respuesta	38

## RESUMEN

La epilepsia es la enfermedad neurológica más frecuente en las mujeres embarazadas y requiere tratamiento continuo durante el embarazo, ya que aproximadamente un tercio de las pacientes experimenta un incremento en la frecuencia de las convulsiones durante la gestación, lo que conlleva a un mayor riesgo de presentar complicaciones durante el embarazo y el parto. Entre los fármacos utilizados para el tratamiento de la epilepsia se encuentra la fenitoína; siendo el fármaco de interés en el presente trabajo, debido a que es uno de los agentes anticonvulsivos más utilizados que ayuda a controlar varios tipos de epilepsia sin causar depresión del SNC. Por lo que se evaluaron los efectos que tiene la fenitoína sobre la formación del sistema nervioso utilizando como modelo biológico embriones de pollo libres de patógenos, los cuales se incubaron para iniciar el desarrollo embrionario y, posteriormente en el estadio 4.5, se inocularon con la fenitoína y fueron incubados nuevamente; los embriones fueron extraídos a las 14 h después del tratamiento; determinándose el número de somitas, la longitud cráneo-caudal, la longitud y ancho de la porción craneal y se midió la apertura del tubo neural, posteriormente se analizaron en busca de malformaciones y resorpciones, los resultados fueron sometidos a análisis estadístico, para determinar los efectos de la fenitoína sobre los embriones de pollo.

## INTRODUCCIÓN

La epilepsia es la enfermedad neurológica más frecuente en las mujeres gestantes y requiere tratamiento continuo durante el embarazo, ya que aproximadamente un tercio de las pacientes experimentan un incremento en la frecuencia de las convulsiones durante la gestación lo que implica un mayor riesgo de complicaciones tanto para la madre como para el feto. Todos los fármacos antiepilépticos básicos se han asociado con alguna de las anomalías englobadas en la denominada embriopatía por antiepilépticos, y la información para los nuevos fármacos antiepilépticos es todavía limitada y no permite establecer su seguridad con respecto a los primeros; por lo que es importante mantener una buena adherencia al tratamiento, que en un principio será con los fármacos que mejor controlen la enfermedad; dado que un mal control de la enfermedad incrementa el riesgo de convulsiones y su efecto es perjudicial tanto para la madre como para el feto. Aunque es controvertida la reducción del riesgo teratológico de los fármacos antiepilépticos, se les recomienda a las mujeres que planeen embarazarse, el consumo de suplementos de ácido fólico durante el periodo periconcepcional y al término de la gestación la administración de vitamina K, tanto a la madre como al neonato. Con motivo de estudiar los efectos de la fenitoína durante el embarazo se han realizado varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que hacen referencia a los efectos y mecanismos de acción de la fenitoína, utilizando como modelos embriones de ratón, rata y enzimas, obteniendo resultados positivos a malformaciones en los embriones.

## I. ANTECEDENTES

En el desarrollo del cerebro humano están comprometidas 100 billones de neuronas y alrededor de medio trillón de células gliales, conformando la estructura más compleja del ser humano. Encontrándose en la zona germinativa, en la cavidad central de la prolongación del tubo neural, las células que migrarán y darán origen a las distintas estructuras que conformaran el cerebro, aquellas destinadas a conformar la corteza utilizan fibras radiales de astroglias especializadas en guiarlas y algunos grupos neuronales deben desplazarse siguiendo caminos relativamente largos. Esta migración de neuronas es uno de los eventos más críticos en la formación del cerebro, dado que para su resultado final influyen múltiples factores, en particular distintos tiempos de ocurrencia y mecanismos de inducción citoesqueléticos que a su vez pueden ser inactivados por acción de otras macromoléculas. Las primeras neuronas generadas en la placa subcortical del embrión servirán de guía y sostén de las que deben llegar a su sitio definitivo de acción. Una vez realizado este trabajo, están programadas para morir. Este fenómeno de eliminar células se conoce como apoptosis, que junto con la migración adquieren gran relevancia en la génesis de convulsiones. A partir de su sitio definitivo, las neuronas desarrollan extensas arborizaciones axonales y dendríticas en un proceso que es actividad-dependiente, llegándose a configurar así un sistema interconectado de alrededor de  $10^{15}$  sinapsis. En este proceso intervienen numerosos factores de crecimiento y agentes tróficos que actúan como neuromoduladores y neurotransmisores. En algunas regiones, como sucede en las áreas límbicas y neocorticales, se desarrollan más las sinapsis excitatorias que las inhibitorias, las primeras mediadas al principio por receptores de glutamato y N-Metil-D-Aspartato en desmedro de los sistemas inhibitorios GABA que están aún poco desarrollados (Troncoso y col., 2001).

Entre las alteraciones del funcionamiento de las neuronas se encuentra la epilepsia que ha sido descrita en diferentes continentes desde tiempos antiguos, teniendo las primeras referencias escritas en los textos de medicina babilónica (antashubba o enfermedad de las caídas) y las descripciones hechas 600 años



después por Hipócrates. Estimándose que en la actualidad la epilepsia afecta de 40 a 200 millones de personas aproximadamente alrededor del mundo. De las cuales 5 millones existen en Latinoamérica, y según estudios epidemiológicos, la epilepsia se encuentra dentro de las cinco primeras causas de enfermedad neurológica en todo el mundo y se calcula que de 1 a 3% de la población tendrá epilepsia en algún momento de su vida. La tasa general de prevalencia de la epilepsia varía de 4 a 8 por cada 1000 habitantes en países industrializados, mientras que en los no desarrollados, especialmente Latinoamérica, África y parte de Asia, es de 5 a 57 por cada 1000 habitantes. La incidencia suele ser más alta en hombres que en mujeres y varía con la edad (Garza, 2004).

Aun cuando la incidencia es más alta en hombres que en mujeres; la epilepsia es más frecuente en mujeres embarazadas; siendo para ellas mayor el riesgo de presentar complicaciones durante el embarazo y el parto, y que su descendencia presenta defectos tales como muerte fetal, malformaciones congénitas, prematuridad, bajo peso al nacer y hemorragia neonatal. Con base en múltiples estudios que indican que la exposición intrauterina a fármacos antiepilépticos incrementa el riesgo de malformaciones congénitas mayores, y la mayoría de los autores considera que este riesgo es de 2 a 3 veces superior al de la población general. No obstante, alrededor de un 90% de las mujeres epilépticas tienen hijos sanos (Rebordosa y Aguilera, 2004).

Las convulsiones son el síntoma habitual de la epilepsia, que es una enfermedad crónica caracteriza por episodios críticos recurrentes denominados crisis epilépticas; las cuales son originadas por descargas paroxísticas, hipersincrónicas excesivas e incontroladas de gran número de neuronas. Estas descargas pueden ser parciales o generalizadas, en las primeras se inician en un foco o grupo de neuronas de características anormales y en las segundas de forma dispersa. Las neuronas o su entorno (vasos y glías), pueden ser afectados por el sustrato biológico que origina la epilepsia el cual puede ser localizado o generalizado; entre estas afecciones se han descrito alteraciones electrofisiológicas (cambios paroxísticos de despolarización), morfológicas (anatómicas, histológicas o ultraestructurales), neuroquímicas

(neurotransmisores y receptores), iónicas (alteraciones de la concentración de sodio y potasio, de la actividad de la bomba sodio/potasio o de la concentración de amonio), metabólicas y endocrinológicas (Flores y col., 1998). Por lo que una persona puede experimentar una sola convulsión o muchas convulsiones, aunque la causa exacta de la convulsión puede no llegar a saberse. Durante la convulsión, la persona puede tener los labios morados y no respirar con normalidad. Los movimientos a menudo van seguidos de un período de somnolencia o desorientación. Otras causas menos frecuentes de convulsiones son: algunas infecciones virales, tumores, hemorragias cerebrales, toxemias como la uremia y las intoxicaciones por plomo o cocaína, alteraciones metabólicas como la hipoglucemia y el alcoholismo agudo o crónico. Algunos tipos de epilepsia son hereditarios. Dependiendo de la parte del cerebro afectada, existe una gran variedad de síntomas posibles en un ataque o convulsión. Muchos tipos de ataques ocasionan desmayos con movimientos espasmódicos o temblor del cuerpo. Sin embargo, algunos ataques consisten en episodios de mirada fija que pueden pasar inadvertidos con facilidad. Ocasionalmente, pueden causar sensaciones anormales temporales o molestias visuales. Por lo general, los ataques o convulsiones se pueden clasificar en "simples" (no cambia el nivel de conciencia) o "complejos" (cambia el nivel de conciencia). También se pueden clasificar como generalizados (afecta todo el cuerpo) o focales (afecta solo una parte o un lado del cuerpo). La epilepsia es una enfermedad crónica con convulsiones recurrentes (Garza, 2004).

Uno de los principales fármacos utilizados para el tratamiento de la epilepsia es la fenitoína. Este es uno de los agentes anticonvulsivos más utilizados que ayuda a controlar varios tipos de epilepsia sin causar depresión del SNC. Es eficaz contra las crisis convulsivas generalizadas y las parciales, pero puede agravar las de ausencias (crisis generalizadas no convulsivas) y las crisis que se manifiestan como pérdida del tono postural o por contracciones bruscas e involuntarias de alguna parte del cuerpo. La fenitoína se absorbe bien por vía oral, se une en parte a proteínas plasmáticas y se metaboliza en el hígado, donde puede provocar, después de la administración crónica, inducción

enzimática. Dado que la fenitoína se administra frecuentemente por largos periodos (hasta años), los efectos adversos son frecuentes (López y col., 2005).

La fenitoína fue sintetizada en 1908 por Bilz, pero su actividad anticonvulsiva no fue descubierta hasta 1938. Desde entonces es el fármaco más utilizado para el tratamiento de las convulsiones, estando indicada en las crisis tonicoclónicas generalizadas, crisis parciales, convulsiones focales y neuralgia del trigémino. Aunque químicamente está relacionada con los barbitúricos, no pertenece a esa clase de fármacos, (Figura 1). La fenitoína tiene también propiedades antiarrítmicas y se considera el antiarrítmico de elección en la intoxicación digitalica antes de la utilización de los fragmentos Fab (Martín-Calderón y col., 2001).

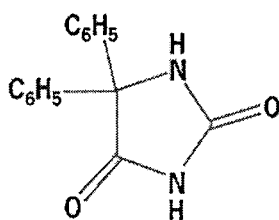


Figura 1. Estructura de la fenitoína. La fenitoína es una estructura cíclica con dos oxígenos unidos por medio de dobles enlaces al carbono, dos fenilos y dos grupos N-H (Martín-Calderón y col., 2001).

### I.1. Farmacología y Farmacocinética

La fenitoína es un ácido débil con un pKa de 8.3 soluble solo en medio alcalino, por lo que las formulaciones parenterales deben ser preparadas en propilenglicol; las formas solubles precipitan en medio ácido pero pueden ser diluidas en suero fisiológico (pH 5.0) si se administra inmediatamente. Ya que la fenitoína es soluble en medio alcalino, su absorción en un medio ácido como el del estómago es muy baja, absorbiéndose fundamentalmente en el duodeno. Los niveles pico se alcanzan de dos a ocho horas después de la administración de una dosis oral. En los casos de intoxicación, la absorción puede mantenerse

hasta 7 días después, debido a la disminución del vaciamiento gástrico y a la formación del farmacobezoar. El 90% de la fenitoína absorbida se une a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina; la fenitoína atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria por lo que se encuentra en líquido cefalorraquídeo, plasma fetal y materno en un 10%. La excreción de la fenitoína es por vía renal eliminándose de 1-5%. Tiene un periodo de semivida de 8-60 horas en adulto y en niños de 12-22 horas. La fenitoína tiene un volumen de distribución de 0.6 L/Kg., siendo muy liposoluble por lo que difunde fácilmente dentro de todos los tejidos incluyendo el SNC (fundamentalmente el tronco del encéfalo y el cerebelo) (Guerrero y col., 1999; PLM, 2007; Martín-Calderón, 2001). Las causas de las malformaciones en los hijos de madres que se encuentran medicadas con fenitoína no están claras y podrían ser multifactoriales, pero es indudable que los fármacos antiepilépticos son potencialmente teratógenos, sobre todo cuando se administran en poli terapia y en dosis altas. Su efecto a largo plazo sobre el desarrollo psicomotor de la descendencia es desconocido, las anomalías causadas se han englobado en la embriopatía por antiepilépticos (Rebordosa y col., 2004). No está bien relacionado los efectos de la dosis pero puede ocasionar movimientos anormales, neuropatía subclínica, hipertricosis, hiperplasia gingival, trastornos del tejido conjuntivo, hipocalcemia y depleción de ácido fólico (Flores y col., 1998).

El espectro antiepiléptico de la fenitoína es similar al de la carbamazepina y más limitado que el del valproato. La fenitoína actúa inhibiendo los canales de sodio, bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Además, la fenitoína regula la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y tiende a restablecer el desequilibrio iónico provocado por un exceso de despolarización. Cuando se encuentra a concentraciones altas inhibe la entrada de calcio durante la fase de despolarización y su movilización intracelular, haciendo interferencia con los sistemas dependientes de la calmodulina y de los nucleótidos cíclicos e inhibiendo la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores. Actúa más en corteza cerebral que en diencefalo. Teniendo mayor efecto en las neuronas normales que propagan las descargas y las que

descargan anormalmente, mas que en las del foco epiléptico y las de transmisión normal, por lo que carece de un efecto sedante (Flores y col., 1998; Martín-Calderón y col., 2001).

En mujeres embarazadas con eclampsia se realizó una comparación entre el sulfato de magnesio y la fenitoína en el cual se evaluó la calidad de seis estudios clínicos en 897 mujeres, en este estudio se observó una reducción significativa de la recurrencia de convulsiones. Se consideró la tendencia en la mortalidad materna por su relación con el sulfato de magnesio y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En los neonatos de las madres que usaron sulfato de magnesio se observó una menor cantidad de ingresos a la unidad especial de cuidados neonatales. De acuerdo a los datos anteriores se consideró que es mejor el uso de sulfato de magnesio que la fenitoína en el tratamiento de eclampsia (Duley y Henderson-Smart, 2006).

Se realizo un estudio en 20 mujeres medicadas con fenitoína para determinar la seguridad de la lactancia en sus hijos, en el cual se evaluó la excreción de fenitoína en leche materna en los días 5, 15, 30, 45 y 60 del posparto, también se determino si la eliminación varia con respecto a los cambios fisiológicos que sufre la madre, para lo cual se midió la concentración de fenitoína en plasma; las muestras fueron tomadas antes de la dosis, de lactar y después de la dosis a las 2, 3, 4, 5, y 8 horas, teniendo como resultado que la concentración máxima obtenida en plasma fue de  $10.2 \pm 5.8 \mu\text{g/ml}$  a las 4 horas después de la dosis y de  $2.71 \pm 1.94 \mu\text{g/ml}$  en la leche para el primer día, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa en los demás días de estudio, en cuanto al índice de excreción fue de 0.34 a 0.129, y la dosis que recibirá un recién nacido durante la lactancia es menor de la dosis terapéutica para lactantes con problemas de convulsiones (0.022 a 0.190 mg/Kg/día), en cuanto a la eliminación fue mayor en los días 45 y 60 ( $p < 0.05$ ), y en cambio para la depuración y distribución los valores se aumentaron en los primeros días; por lo que se concluyo que es segura la lactancia durante la administración de fenitoína (Belmont-Gómez y col., 1996).

Al estudiar la embriotoxicidad y características de exposición de la fenitoína en cultivos de embriones de rata en un experimento comparativo *in vivo* e *in vitro* se les administro de 50 a 150  $\mu\text{g/mL}$  *in vitro* por vía intra-embryónica, evaluando el efecto el día 11 de gestación ó 500 a 1500 mg/Kg de masa corporal *in vivo* por medio de una sonda gástrica, observándose los efectos el día 10 de gestación, también en este día se evaluó la cinética administrándole una dosis única, en cuanto al desarrollo y defectos de gestación se observaron el día 21. Observándose que los efectos fueron mas pronunciados *in vitro* que *in vivo* para el día 11 de la gestación; en la exposición en el medio de cultivo para el día 10 y 11 de gestación se observaron efectos embriotóxicos *in vitro*, sin embargo para el día 11 de gestación *in vivo* fueron mínimos; esta discrepancia se debe a las características de exposición que determinan los efectos embriotóxicos para ambos grupos; en el caso de los parámetros farmacocinéticos no se observaron diferencias en ambos grupos. Lo que indica que la absorción es un factor limitante para el rango de dosis. En cuanto a las malformaciones se observaron en el día 21 de gestación abarcando los defectos urogenitales, cráneo-faciales y sistema esquelético (Beekhuijzen y col., 2000).

Al estudiar la relación entre el enlace covalente de la fenitoína y la embriopatía llevado a cabo en embriones de ratón co-cultivados con hepatocitos de ratón, rata y conejo. Se evaluó la teratogénesis de la fenitoína *in vivo* e *in vitro* tomando como día uno el día 9.5, cultivando los embriones por separado o co-cultivados con hepatocitos maternos de ratón, rata y conejo macho por 24 horas, exponiendo a los embriones a los potenciales efectos del metabolismo de la fenitoína de cada especie; observándose que en ausencia de hepatocitos la embriotoxicidad de la fenitoína dependía de la concentración (0, 10, 20 y 60  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados indicaron una disminución en el crecimiento del embrión, reflejado por la reducción del diámetro y longitud del saco, aparentemente en el rango terapéutico materno (20  $\mu\text{g/ml}$ ). El enlace covalente de la droga a nivel embrionario es significativamente elevado en comparación con los embriones control previamente sacrificados y fijados, sugiriendo el poder de la fenitoína bioactivada a un reactivo intermediario tóxico para el embrión. Los embriones de ratón crecieron de manera igualmente con los hepatocitos agregados de las 3

especies lo que sugiere la compatibilidad de tejidos. Al estudiar los efectos de la fenitoína en embriones de ratón a los que se agregó hepatocitos de conejo o rata se observó un deterioro significativamente mayor que se ve reflejado al disminuir el número de somitas. Lo que sugiere que los embriones de ratón pueden bioactivar intrínsecamente a la fenitoína en un intermediario reactivo, que tiene efectos embriotóxicos. La protección conferida por los hepatocitos maternos de ratón sugiere un balance bioquímico favorable de desintoxicación materna especie-específico, esto no es compartido por los hepatocitos de ratón y conejo con lo que se realiza la embriopatía de la fenitoína. De este modo, se entiende que la teratogenicidad de la fenitoína implica probablemente la bioactivación embrionaria, la contribución variable de determinantes maternos a la susceptibilidad teratogénica de una manera especie-específicas (Ozolins y col., 1995).

Al estudiar la protección que confiere la UDP-Glucuronosiltransferasa (UGTs) al ADN contra la oxidación y la formación de micronúcleos producidos por la fenitoína y su metabolito embriotóxico 5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina. Se tomo en cuenta que la UDP-Glucuronosiltransferasa es importante en la eliminación de la mayoría de los xenobióticos, incluido el 5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina; sin embargo se cree que este metabolito puede ser alternativamente bioactivado por peroxidases, como la sintetasa de la prostaglandina H, la cual lo transforma en un intermediario reactivo que inicia la oxidación del ADN (reflejada por la aparición de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina), la genotoxicidad (reflejada en la formación de micronúcleos) y la embriopatía; fueron evaluados en cultivos de fibroblastos de piel heterocigotos (+/j) y homocigotos (j/j) UGT deficientes de ratas gunn y embriones de ratón, confirmados directamente *in vivo* para GN-glucoronidación de la fenitoína en ratas gunn. Observándose que 5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina a una concentración de 80µM aumento los micronúcleos en 2.0, 4.8 y 4.6 veces en células normales +/+ UGT (P=0.03) y en células UGT deficientes (P=0.0001) respectivamente. En el caso de células +/j (P=0.02) y j/j (P=0.4) UGT deficientes se aumentaron los micronúcleos en 3.0 y 3.4 veces con respecto a las células normales UGT. Para la concentración de 10µM no indujo la formación de micronúcleos en las células +/+ UGT normales,

sin embargo se incremento en 4 y 3.8 veces en las células +/j y j/j UGT deficientes (P=0.0001) respectivamente; e incrementándose 2.0 y 3.0 veces en células +/j (P=0,007) y j/j (P=0.0002) UGT deficientes, respectivamente en comparación con células +/+ UGT normales. En las células j/j UGT deficientes se observo un incremento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, pero en las células +/+ UGT normales no, en la concentración de 80µM (P=0.05). A esta misma concentración la embriopatía se potencio en el cultivo de embriones, reflejándose en la disminución del cierre anterior del neuroporo, torneado, diámetro y longitud del saco (P=0.05). Proporcionando la primera evidencia sobre la bioactivación oxidativa y toxicidad de la fenitoína pueden ser evitadas por la N-Glucoronidación directa, siendo confirmado por espectrofotometría de masas. Estos resultados indican que una deficiencia en UGT, la 5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina es un potente mediador de la fenitoína para iniciar la genotoxicidad y embriopatía (Kim y col., 1997).

Yu y Wells, en 1995 realizaron un estudio para encontrar evidencia de la bioactivación de la fenitoína en un intermediario reactivo teratogénico catalizado por la lipoxigenasa, se realizaron dos estudios uno *in vitro* utilizando la lipoxigenasa dependiente de ácido linoleico de soja y otro *in vivo* utilizando ratones preñados CD-1. Para observar el efecto teratogénico de lipooxigenasa (LPO) y de la sintetasa de la prostaglandina H (PHS) se evaluó tanto *in vivo* como *in vitro*. El papel potencial que tiene la LPO en la bioactivación de la fenitoína, se incubo *in vitro* midiendo las condiciones dependientes de ácido linoleico, y la LPO de soja fue catalizada por la unión a proteína de la fenitoína lo que inicia la teratogénesis. Bajo condiciones óptimas, fenitoína 4.24 nM [3H], 100.000 unidades de la soja LPO (tipo 1B, producto Sigma chemical Co. químico Co.), y 5 mg de albúmina de suero vacuno, con o sin 5 mM de ácido linoleico, fueron ajustados con buffer 100 mM Tris-HCl (pH 9) a un volumen final de 1 ml e incubado en 37 °C por 60 min. Adicionando como sustrato ácido linoleico al medio de incubación, con lo que se elevo al triple el enlace covalente (p < 0.05). El enlace covalente de la fenitoína dependiente del ácido linoleico fue inhibido en una manera dependiente de la concentración por los inhibidores selectivos y no selectivos de LPO/PHS, indometacina, el ácido



nordihidroguaiaretico, la quercetina, el BW755C, y el ácido 5.8.11.14 eicosatetranoico (ETYA) y para inhibir la hidroxiperoxidasa se utilizo metamizol ( $p < 0.05$ ). *In vivo*, los días 12 y 13 de gestación, los ratones preñados CD-1 fueron tratados con el inhibidor dual irreversible PHS/LPO ETYA (0, 0.5 de, 5, 50, 100, y 125 mg/kg ip) o su vehículo, 2 horas antes de una dosis teratogénica de fenitoína (65 mg/kg ip). Los ratones fueron sacrificados el día 19 y los fetos fueron extraídos por cesárea. El tratamiento previo de ETYA produjo una disminución relativa a la dosis teratogénica de la fenitoína (65 mg/kg), con reducciones máximas por 50 mg/kg de ETYA en la incidencia de los fetos con paladar hendido inducidos por fenitoína (1.8 +/- 1.8% contra 26.8 el +/- 3%) (% +/- SE;  $p < 0.00001$ ) y resorciones (22.5 el +/- 5% contra 60 el +/- 2%) ( $p < 0.05$ ). Dosis más altas de ETYA eran embriotóxicas. La reducción en teratogenicidad de la fenitoína por el inhibidor dual PHS/LPO ETYA era considerablemente mayor que lo reportado previamente para el ácido acetyl salicílico, que inhibe solamente PHS;

Miranda y col, en 1994 estudiaron la bioactivación catalizada por la peroxidasa embrionaria y la citoprotección conferida por el glutatión-dependiente en la teratogenicidad de la fenitoína, la cual es modulada por el ácido eicosatetranoico y el sulfoximina butionina en cultivo de embriones murinos. La cual se comprobó usando el ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico, que es un inhibidor dual de dos sistemas de peroxidasas (la sintetasa de la prostaglandina H y la lipooxigenasa), tomándose como día uno el día 9.5 a partir de la formación del tapón vaginal en los ratones CD-1, y ese mismo día fueron extraídos y puestos a incubar en un medio de cultivo (suero masculino de rata al 35%, suero vacuno fetal al 15%, y medio Waymouth al 50%) por 24 horas a 37°C y saturado con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. En el cual se utilizo una concentración no embriotóxica de ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico (0, 40, 80, 100 µM) el cual fue utilizado dentro del valor inhibitorio de la peroxidasa ( $K_i=4-8\mu M$ ), posteriormente fueron incubaron con la concentración terapéutica de la fenitoína (20µg/ml ó 80µM), otro grupo con ácido 5, 8, 11,14-eicosatetranoico (40µM), y con una combinación de ambos. Donde se encontró que el ácido 5, 8, 11,14-eicosatetranoico por debajo de 100µM no tenía efecto en el saco vitelino, la longitud cráneo-caudal, el desarrollo de

somitas, el cierre anterior del neuroporo. En cuanto a la fenitoína se determinó que era embriotóxica, causando una reducción en el diámetro del saco del vitelino, la longitud cráneo-caudal y en el desarrollo de somitas ( $p < 0 = 0.0001$ ). En cuanto a la combinación de fenitoína con ácido 5, 8, 11, 14- eicosatetraenoico se encontró un aumento en el diámetro del saco vitelino, desarrollo de somitas, y la longitud cráneo-caudal ( $p < 0 = 0.01$ ), lo que indica la inhibición de la peroxidasa embrionaria por el ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico, confiriéndole una citoprotección. En cuanto a la glutatión se encontró que tiene un rol importante en la desintoxicación de los radicales libres de la fenitoína o su transformación en especies reactivas del oxígeno, y la reducción del enlace covalente, la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo que inician la embriotóxica o la muerte; esta hipótesis fue probada utilizando cultivos que se encontraban en ausencia o presencia de 1mM de sulfoximina, el cual es un inhibidor de la síntesis de glutatión, por 3 horas y después lavada con BSO y puestos en un cultivo fresco por 24 horas que contenía 80 $\mu$ M de fenitoína o un vehículo, midiendo los tioles solubles (incluido el glutatión) y los disulfuros (incluido el glutatión oxidado) por cromatografía de líquidos de alta resolución; Inmediatamente después del tratamiento con BSO, no se encontró diferencia entre las concentraciones de glutatión y el glutatión oxidado entre los embriones tratados con BSO y los controles; después de 24 horas la concentración de glutatión en los embriones no tratados incremento 17% y en los embriones tratados con BSO se redujo a un 15% con respecto a los controles.

Al estudiar la existencia en la alteración de los niveles de corticosterona en plasma materno durante el tratamiento con fenitoína, siendo posible que la teratogénesis de la fenitoína no es resultado de una interacción entre medicamentos, pero puede estar mediada indirectamente por glucocorticoides. Para lo cual se utilizaron ratones A/J sensibles a los efectos embriotóxicos (para los glucocorticoides y la fenitoína) y ratones B6 (C57bl/6) relativamente mas resistentes (para glucocorticoides sintéticos y fenitoína); a los cuales se les administro por vía intraperitoneal a los ratones A/J preñados una concentración de 25 (dosis no teratogena) o 75 mg/Kg y para ratones B6 la dosis fue de 75 mg/Kg de peso corporal el día 10 de gestación, para el grupo control se les

administro el vehículo (agua destilada pH 11), siendo sacrificados los ratones en distinto tiempo después de la administración, obteniendo las muestras de plasma, determinándose los glucocorticoides por radioinmunoensayo, observándose en el grupo control un nivel elevado de corticosterona después de la administración, la cual se redujo gradualmente, presentándose un aparente efecto en el ritmo cardiaco en las muestras obtenidas por la tarde. En la dosis no teratogena administrada a ratones A/J se observo un aumento temporal en los niveles de corticosterona, el cual disminuyo al nivel del grupo control a las 6 y 24 horas después de la administración; sin embargo; para la dosis teratogena aplicada a los ratones A/J se mantuvo elevada durante las 48 horas. En el caso de ratones B6 se elevo el nivel plasmático de corticosterona a las 24 horas de la administración de 75 mg/Kg, reduciéndose a las 30 horas a un valor igual que los controles; la respuesta de corticoesteroides suprarrenales a la fenitoína en ratones A/J es mucho más sensibles en comparación con los ratones B6, teniendo una relación entre los niveles de fenitoína y corticosterona. Por lo que el prolongado aumento de corticosterona en el plasma durante la organogénesis puede ser un factor en la incidencia de labio leporino y paladar hendido después de la administración en ratones A/J (Hansen y col., 1988).

Se estudio la embriotoxicidad de la fenitoína en ratones adrenalectomizados CD-1, ya que se cree que la fenitoína y los glucocorticoides inducen fisura orofacial por el mismo mecanismo, en un trabajo anterior se demostró que la fenitoína aumento significativamente las concentraciones de corticosterona materna en aproximadamente 48 horas después de la administración en ratones A/J. se estudio la embriotoxicidad de la fenitoína en ausencia de glucocorticoides endógenos maternos, retirando en el día 7 de gestación las glándulas suprarrenales maternas, determinándose la incidencia de la fisura después del tratamiento con fenitoína, observándose un alto nivel de la toxicidad maternal después de la adrenalectomía y del tratamiento de fenitoína en 60 o 75 mg/Kg, esta toxicidad fue producto de una alteración en las niveles maternos de la droga en madres adrenalectomizadas, en la concentración de 60 mg/Kg de fenitoína se observo un aumento en la incidencia de fisura en sus descendientes; sin embargo esta concentración no eleva los niveles de

corticosterona durante la maternidad de ratones adrenalectomizados, indicando que la fenitoína es capaz de producir fisuras en ausencia de corticosterona materna endógena (Hansen y col., 1992).

Fort y Bantle en 1990, realizaron un estudio basado en el modelo de *Xenopus* para explorar la teratogenicidad de la difenilhidantoina (DPH) y de un sistema metabólico exógeno en el desarrollo. Los embriones de la rana africana del sur, *Xenopus laevis* fueron expuestos a difenilhidantoina y a metabolitos hidroxilados (HPPH) en dos experimentos separados de renovación estática con y sin la presencia de un sistema metabólico exógeno de activación (MAS) para 96 horas. Dos pruebas separadas de la dosis-respuesta también fueron conducidas con difenilhidantoina y metabolitos hidroxilados con un MAS modulado por varios inhibidores funcionales mezclados [monóxido de carbono (CO) (de amplio espectro del citocromo P450), cimetidina (principalmente del citocromo P450), y ellipticina (citocromo P448)] y un inhibidor de epóxido hidrolasa (óxido de ciclohexeno). El gravamen del peligro teratogénico potencial fue basado en los índices teratogénicos [TI = 96 horas (la malformación)], los tipos y severidad de malformaciones, y puntos finales del crecimiento del embrión. La adición del MAS intacto a difenilhidantoina aumentó las malformaciones, las cuales sugieren que un metabolito de DPH y un epóxido embriotóxico intermediario pueden servir como la especie teratogénica.

La correlación entre los efectos embriotóxicos y genotóxicos de la fenitoína (DPH) se estudió en ratones gestantes por Barcellona y col. en 1987. Debido a la embriotoxicidad que produce la fenitoína a través de un intermediario llamado oxido de arene y se a encontrado que es un agente genotóxico. Siendo evaluado en ratones gestantes mediante la modulación de las enzimas de la fase I y II del metabolismo. La fenitoína se evaluó mediante embriotoxicidad, teratogenicidad y genotoxicidad, esta última por medio del ensayo de micronúcleos en los eritrocitos policromaticos y en los fetos. Se observo que al inhibir el citocromo P-450 y la hidrasa del epóxido se potencia la embriotoxicidad, con lo que se disminuye la inducción del citocromo P-450; se obtuvieron resultados dudosos al modular la citocromo P-448; en cuanto al

metabolito intermediario de la fenitoína la hidroxifenitoína era ineficaz por si solo, así como al inhibir o inducir la citocromo y la hidrasa del epóxido. En cuanto la genotoxicidad se determino que no tiene efecto sobre el organismo materno, mas sin embargo en el feto se observaron efectos débiles de genotoxicidad; los cuales fueron significativos al inhibir la hidrasa del epóxido, que al momento de inducir los citocromo P-448 y P-450 disminuyeron. No se ejerció ninguna genotoxicidad por p-hidroxifenitoína, aún cuando el patrón enzimático fue modulado. Concluyéndose que el papel principal en la embriotoxicidad de difenilhidantoina es desempeñado por la droga sin cambios, mientras que la presencia de los óxidos de arene es determinante para los efectos genotóxicos.

Al explorar los efectos teratogénicos de la dosis y tiempo en la administración de la carbamazepina, valproato de sodio, y de la difenilhidantoina en el desarrollo cráneo-facial en el feto del ratón CD 1. Las hembras preñadas fueron intubadas en cada uno de los días 8-10, 11-13, 14-16, y 8-16 de gestación con las dosis siguientes para cada droga: 375, 563, 938 mg/kg carbamazepina; 225, 338, 563 mg/kg valproato de sodio; 50, 75, 125 mg/kg difenilhidantoina. Se tuvo un grupo control para cada droga. El día 17 de la gestación se sacrificaron las hembras preñadas y los embriones fueron registrados como vivos o resorciones. Todos los fetos vivos fueron examinados para los defectos cráneo-faciales. Los resultados de la exanimación de 1398 fetos indicaron que carbamazepina, valproato de sodio y difenilhidantoina eran teratógenos y embriotóxicos en todos los niveles de dosis. Este estudio indicó que la disminución observada del peso fetal era por la droga son dependientes de la dosis y tiempo. En cuanto a la relación dosis-tiempo se vio reflejada por el número de fetos muertos y el número de resorciones dependía del tiempo. Las frecuencias observadas de hidrocefalias, hendiduras palatales secundarias, y de hendiduras palatales submucosas eran significativas para los tres factores (droga, dosis, y tiempo) mientras que las frecuencias observadas de hematomas y anencefalias eran significativas solamente por droga y tiempo. Los labios leporinos fueron observados solamente en el nivel de dosis más alta de difenilhidantoina. Al comparar las tres drogas estudiadas se encontró que en este modelo la carbamazepina fue el menos teratógeno y embriotóxico (Eluma y col., 1984).

Al explorar los efectos embriotóxicos de los anticonvulsivos: fenobarbitona, difenilhidantoina y carbamazepina en ratones albinos, tras el tratamiento oral durante la organogénesis en los días 6 al 15 de la gestación con fenobarbitona y difenilhidantoina a dosis de 40 y 170 mg/Kg/día causa signos y síntomas de teratogenicidad respectivamente, observándose una incidencia anormalmente alta de paladar hendido del 4.3% y 9.3% de los fetos respectivamente. En el grupo de control, la incidencia de esta malformación era de 0.13%. No se consideró ningún cambio significativo en las malformaciones después de la administración de carbamazepina en dosis de hasta 250 mg/kg/día. Los resultados indican un retraso del crecimiento fetal después del tratamiento con difenilhidantoina y carbamazepina, pero solamente en los niveles tóxicos. La difenilhidantoina también aumentó la incidencia de las muertes embrionarias tempranas (Fritz y col., 1976).

La evaluación de la neurotoxicidad inducida por fenitoína es importante para las mujeres epilépticas porque continúan con su tratamiento durante el embarazo. El potencial teratogénico de anticonvulsivos es más notable para la fenitoína, trimetadiona, ácido valproico, y carbamazepina. Esta revisión se centra en la evidencia humana y animal para la teratogenicidad de la fenitoína. El síndrome fetal del hidantoina, el cual presenta dos de las siguientes anomalías pre y post natales como la deficiencia de crecimiento, defectos de las extremidades, malformaciones importantes y deficiencia mental. Los datos disponibles sugieren un predominio de síndrome fetal del hidantoina de 10-30% en infantes de las mujeres que ingieren 100-800mg/kg de fenitoína durante el primer trimestre o más allá. Desafortunadamente, los datos sobre el desarrollo del comportamiento en niños con síndrome fetal hidantoina son limitados. La fenitoína produce múltiples disfunciones del comportamiento en descendientes de la rata. Las dosis teratogénicas producen concentraciones séricas de fenitoína en las ratas comparables a las encontradas en seres humanos. Los efectos encontrados incluyen la hiperactividad, el déficit en aprendizaje y la memoria. Los resultados entre humanos y animales para la fenitoína son comparables, sin embargo, las dificultades con estudios existentes es que no se

han ocupado satisfactoriamente de la dosis por lo que es importante continuar con los estudios y ampliarlos hasta llegar a conocer las concentraciones a nivel cerebral (Adams y col., 1990).

Al examinar el nuevo mecanismo para la toxicidad de la fenitoína, la cual puede ser bioactivada enzimáticamente en una reacción intermedia, aumentando la formación de especies reactivas del oxígeno, que pueden dañar macromoléculas esenciales, incluido el ADN. La oxidación del ADN puede inducir rompimientos de doble cadena de ADN (DSBs), las cuales son reparadas mediante recombinación homóloga. Con el aumento de los niveles de DSBs se induce una hiper-recombinación, dando lugar a cambios genéticos deletéreos. Con lo que se postula que la toxicidad iniciada por fenitoína media estos cambios genéticos. Para observar este efecto se utilizaron células de ovario de hámster chino que contiene una línea directa de recombinación nueva de sustrato para determinar si la fenitoína inició la oxidación del ADN, con lo cual se aumenta la recombinación homóloga. Las células fueron tratadas con 0 a 800µM fenitoína durante 5 o 24h, determinando la frecuencia, producto y la estructura de recombinación. Y donde la oxidación del DNA iniciada por la fenitoína se determino mediante la formación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Demostrándose que la fenitoína aumenta tanto la oxidación y recombinación homóloga del ADN, siendo dependiente del tiempo y la concentración, las determinaciones de los productos sugiere una recombinación de genes por medio de la conversión sin estar asociada al cruzamiento, se comprobó que la fenitoína daño el ADN y puede inducir una recombinación homóloga, que puede ser un nuevo mecanismo de mediación iniciado por la toxicidad de fenitoína (Winn y col., 2003).

◉

◉

## 1.2 Desarrollo del Sistema Nervioso

Las sustancias químicas como la fenitoína pueden alterar el desarrollo embrionario, específicamente el desarrollo del sistema nervioso. El desarrollo embrionario inicia con la fecundación que implica la fusión de gametos, posteriormente se divide el embrión por mitosis durante la segmentación. La

primera división origina dos células (la línea divisoria se conoce como "primer surco" por su aspecto externo), la segunda división es perpendicular a la primera (cuatro células) y la tercera corta el plano ecuatorial. El proceso de segmentación da origen a una "pelota" formada por una masa de células que por su aspecto exterior se denomina mórula.

En el interior de la mórula se origina una cavidad llena de líquido: el blastocele, tomando entonces el nombre de blástula o blastocito (en mamíferos). El tamaño decreciente de las células a medida que se dividen incrementa la relación superficie/volumen, permitiendo un intercambio de oxígeno más eficiente entre las células y su entorno. La gastrulación comprende una serie de migraciones celulares a posiciones en las cuales formarán tres capas celulares, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo.

En los cordados a partir del ectodermo se forma el tubo neural que dará origen al sistema nervioso. El mesodermo forma la notocorda (que originará las vértebras) en los extremos cefálico y caudal hay una comunicación con la cavidad amniótica por los neuroporo craneal y caudal (Copp, 2005). También el mesodermo a esta altura forma los somitas, que originan las partes segmentadas del cuerpo como los músculos de la pared corporal.



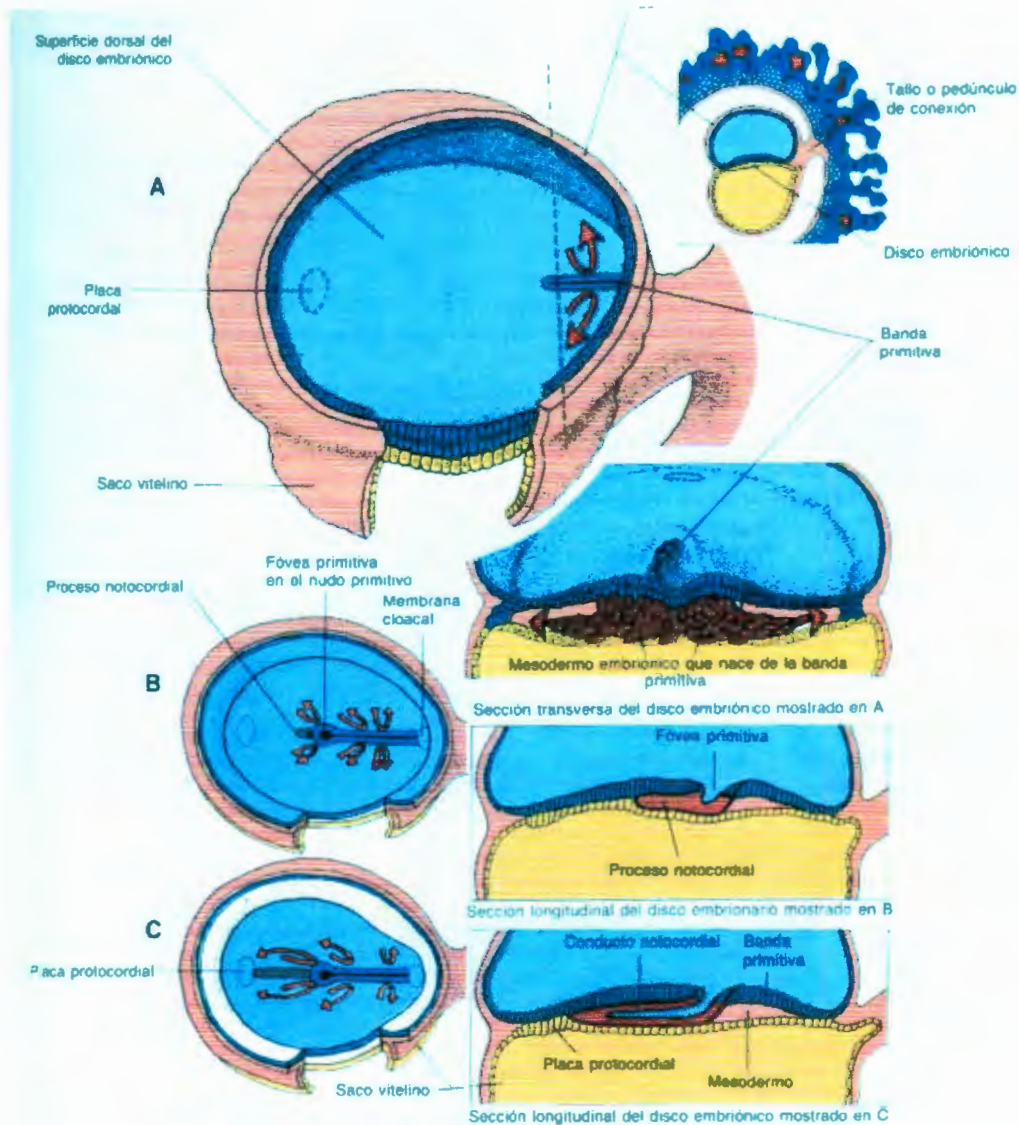


Figura 2. Superficie dorsal del disco e brionario. En la figura se presenta la formación la notocorda que inducirá la formación de la placa neural (Doumet).

La notocorda induce la formación de la placa neural (Figura 2), que posteriormente se invagina para formar el surco neural y mas tarde el tubo neural en el que se distinguen dos parte fundamentales; la porción encefálica del tubo neural: parte superior más voluminosa situada en la cabeza del embrión y de la que derivará el encéfalo y la porción medular del tubo neural: parte más estrecha y larga, situada en el tronco del embrión y de la que derivará la médula espinal (Figura 3).

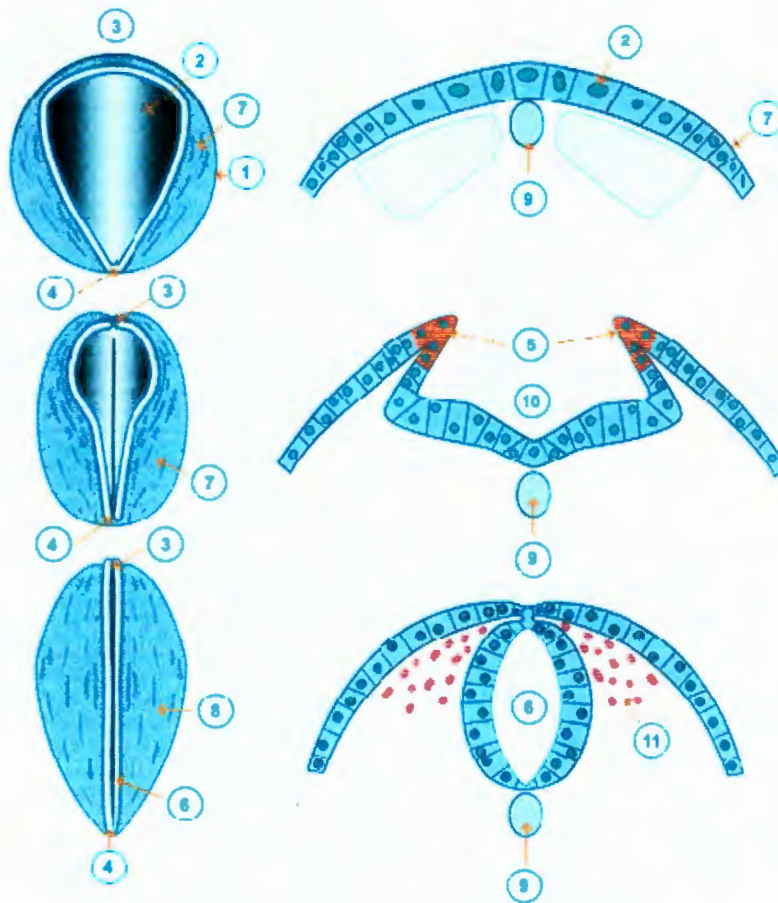


Figura 3. Formación del tubo neural. En la figura se pueden observar: 1. Embrión, 2. Placa neural, 3. Polo anterior o cefálico del embrión, 4. Polo posterior o caudal, 5. Pliegues (bordes) del surco neural que se va formando a partir de la placa neural dando origen al tubo neural, 6. Tubo neural, 7. Ectodermo a partir del cual se formará la placa neural y la epidermis, 8. Epidermis, 9. Notochorda, 10. Surco neural 11. Cresta neural (Chaves, 2006).

La porción encefálica crece de forma desigual dando lugar a tres dilataciones separadas por dos estrangulaciones. A estas dilataciones se les denomina vesículas que de arriba a bajo se denominan: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, a partir de estas vesículas cerebrales continúa la formación del sistema nervioso central (Gos y Szepecht-Potocka, 2002).

Cuando los procesos que dan origen al sistema nervioso no se llevan a cabo adecuadamente se tienen malformaciones como: Anencefalia, que se caracteriza por la ausencia de la bóveda craneana y cerebro; Hidrocefalia, es la acumulación excesiva de líquido cefalorraquídeo dentro del cráneo. Hidranencefalia, el cráneo fetal se encuentra completamente lleno de líquido, no se observa tejido cerebral. Holoprosencefalia, es un desorden dado por una falla de diverticulación cerebral que induce a una malformación de la parte media de la cara y defecto del SNC. Meningocele, defecto del tubo neural como resultado de la herniación o saculación de las meninges a través de la falla del cerramiento del arco vertebral. Meningomielocele, es un defecto del tubo neural como resultado de la herniación o saculación de las meninges y de la médula espinal a través de fallas del cierre del arco y lámina vertebral presentándose con mayor frecuencia en la región lumbosacra. Mielosquisis o Raquisquisis o Disrafismo Espinal, forma más severa de espina bífida en donde los pliegues neurales fallan a encontrarse y fusionarse dejando como resultado a la médula espinal abierta como una masa de tejido nervioso sin ningún tipo de cubierta sea ésta piel fina o membrana. Encefalocele, protrusión del tejido cerebral cubierto por piel a través de un defecto óseo de la bóveda craneal suele denominarse encefalocele. Porencefalia, la caracterizada por la presencia de una malformación quística o cavidad llena de líquido en el parénquima cerebral (Avaria, 2005).

### 1.3. Expresión Génica

A nivel molecular la regulación en la formación del tubo neural, se da en toda la médula espinal en la fase de placa neural y en la cual se expresan todos los factores de transcripción PAX3, PAX7, MSX1, MSX2, siendo este patrón de expresión regulado por sonic hedgehog (SHH), la cual se expresa en la notocorda y la proteína morfogenética ósea 4 y 7 (BMP4 y BMP7), así como en el ectodermo no neural en la frontera de la placa neural. SHH reprime la expresión de PAX3, PAX7, MSX1 Y MSX2 (Figura 4). Así SHH ventraliza el tubo neural, esta región ventral adquiere la capacidad de formar la placa basal, también expresando SHH, y las neuronas motoras de la placa basal, siendo la

expresión mantenida por BMP4 y BMP7 regulando PAX3 y PAX7 en la mitad dorsal del tubo neural, formándose de manera rápida las neuronas sensoriales. Siendo necesarios estos dos genes para la formación de células de la cresta neural en la parte superior de los pliegues neurales, aunque las funciones MSX en la diferenciación de neuronas sensoriales e interneuronas no es clara, su expresión en la placa neural es fundamental en las primeras etapas para la formación de células ventrales, aun cuando su expresión es excluida en etapas posteriores por SHH, por que confiere a los tipos de células ventrales respuestas adecuadamente a SHH en la ventralización y otras señales. Durante la elevación de los pliegues neurales se expresa PAX, PAX6, a excepción de la línea media (Sadler, 2005).

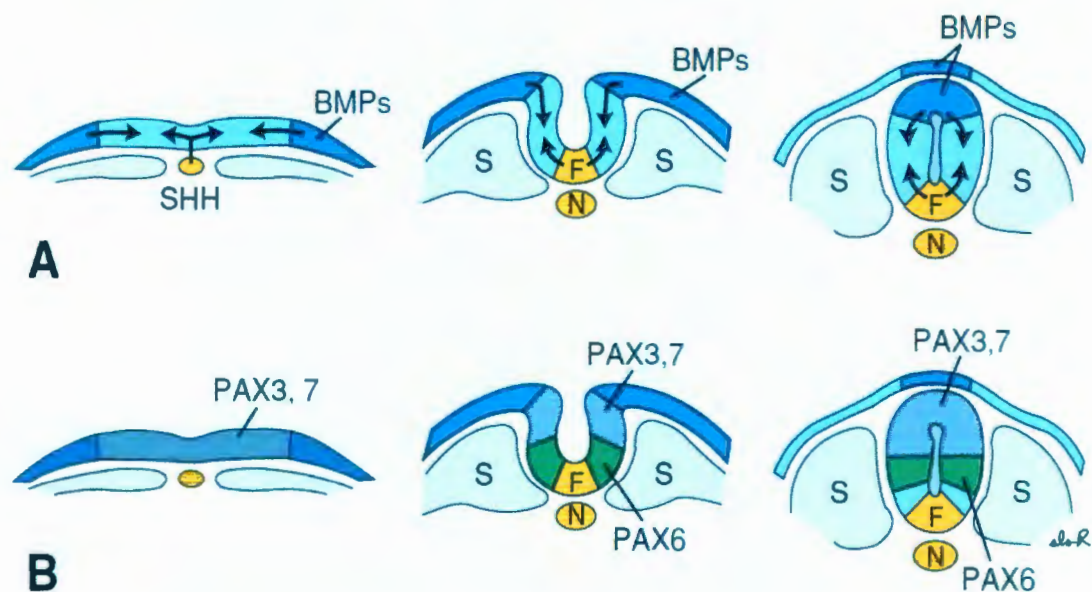


Figura 4. Regulación molecular de la formación de la médula espinal. Observándose en la figura A: el SHH es secretado por la notocorda, ventralizando el tubo neural e induciendo la región de la placa basal (F), así como a la expresión de los genes. Siendo secretadas por el ectodermo no neural las proteínas morfogénicas óseas 4 y 7, contribuyendo así a la diferenciación de la placa del techo y alar. Figura B: iniciando PAX3 y 7 y MSX1 y 2, expresando la uniformidad de la placa transversal neural. SHH reprime la expresión de los genes en la parte ventral media del tubo neural que se convertirá en el piso y placa basal, simultáneamente BMPs eleva y mantiene la regulación de PAX3 y 7 en la parte media dorsal del tubo neural, llevándose a cabo el cierre y elevación de las placas. PAX 6 empieza la expresión

transversal del ectodermo neural así como la su elevación y cierre del techo del tubo neural (Sadler, 2005). Durante la formación del sistema nervioso se activan y desactivan muchos genes tanto para la división celular como para la diferenciación debido a que la información necesaria para dirigir el correcto desarrollo se encuentra en el genoma. En las células eucariotas el ADN se duplica durante el proceso de replicación y la formación de proteínas se lleva a cabo por los procesos de transcripción y traducción. Para llevar a cabo el proceso de transcripción, las células eucariotas cuentan con varios tipos de RNA polimerasas; la RNA polimerasa I (pol I) transcribe los principales genes ribosómicos, la RNA polimerasa III (pol III) los principales genes y RNA pequeños y la RNA polimerasa II (pol II) transcribe los genes estructurales y algunos genes de RNA pequeños. Para comenzar con la transcripción cada una de estas enzimas debe contener un factor de iniciación. La pol I no necesita de factores complejos, en cambio para que la pol III comience la transcripción es necesario que se encuentren presentes los factores de transcripción TFIIB Y TFIIC (participan en la transcripción del gen tRNA) y el TFIIA (para el gen 5S), en el caso de la pol II es necesario que se una a la caja TATA la cual actúa como un elemento de control, cuya función es la de fijar el punto de iniciación de la transcripción y que se encuentren los factores asociados a la unión con TATA, como el TFIID (Reconocimiento del centro del promotor (TATA); reclutamiento de TFIIB; y reconocimiento del centro del promotor (elementos no-TATA); funciones reguladoras positivas y negativas), TFIIA (Estabilización de la unión TBP, estabilización de la unión TAF-ADN y función antirrepresora), TFIIB (Reclutamiento de RNA pol II-TFIIF; selección del lugar de comienzo por la RNA pol II), TFIIF(Direccionamiento de la pol II al promotor; desestabilizando las uniones inespecíficas RNA pol II-ADN), TFIIE (Reclutamiento de TFIIH; modula las actividades helicasa, ATPasa y quinasa de TFIIH), Y TFIIH (Función del promotor utilizando la actividad helicasa); y un promotor en el que se encuentra la caja de unión TATA que es la señal de unión mas común.

La parte del ADN donde se unen los factores de transcripción se llama elemento de control cuya función es la de fijar el punto de iniciación. La transcripción puede ser modificada por factores que actúan en trans, ya sea a nivel de

promotores o bien en secuencias potenciadoras. Durante la elongación de la transcripción se liberan factores transcripcionales centrales y la pol II junto con TFIIF, en esta etapa también adquiere factores de elongación algunos de los cuales colaboran con la enzima en los lugares de pausa del ADN, entre estos factores se encuentra el factor de remodelado de los nucleosomas y un factor de elongación específico (FACT). La terminación de la transcripción se realiza por medio de la polimerasa II, la cual pasa por varias señales AATAAA las cuales se encuentran después del extremo 3', el pre-mRNA transporta la señal por medio de la secuencia AAUAAA, es cortado por endonucleasa especial, la cual reconoce esta señal. En esta parte al mRNA se le añade una cola de ácido polirriboadenilico (poli A), esta unión se lleva a cabo con la ayuda de una polimerasa especial que no está dirigida por un molde. Este RNA es transportado al citosol para la traducción, este pre-mRNA contiene todavía muchos intrones y regiones de flaqueo, que deben ser eliminados para una correcta traducción, el mRNA pasa por varios procesos los cuales comienzan cuando aún está dentro del núcleo, la primera modificación que sufre es en el extremo 5' en el cual de forma inversa se le une un GTP, junto con dos primeros nucleótidos, a lo que se conoce como caperuza, esta se complementa con la adición de grupos metilos en la posición N-7 de la guanina y en uno o dos grupos hidroxilos de la caperuza, esta caperuza sirve para colocar el mRNA en el ribosoma para la traducción. Una vez formada la caperuza el pre-mRNA forma complejos con diferentes partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNP), las cuales están formadas por complejos de RNA nucleares pequeños (snRNA) y proteínas de corte y empalme, este complejo snRNA-pre-mRNA se denomina espliceosoma, este es el proceso de refinamiento del pre-mRNA debido a que en esta parte se eliminan los intrones. Una vez formado el complejo los snRNA se unen a los sitios de unión de intron-exon mediante secuencias complementarias. Esta secuencia comienza con la adición de la snRNP U1 al lugar G del extremo 5' del intrón, seguido de la unión de snRNP U2 al lugar de ramificación, con lo que se unen la snRNP para formar un bucle de unión entre exones; Con lo que libera el mRNA ligado y un bucle de intrón. La traducción se realiza en los ribosoma 80S (formado por las subunidades 40S y 60S), la iniciación de esta etapa requiere que varios factores que se unan a las

subunidades ribosomales y otras al RNA, entre las que destaca el factor de iniciación eIF2, el cual forma un complejo con el tRNA para esto es necesario el eIF2B. La terminación de la cadena requiere solo de un factor proteico, el eRF, que reconoce tres codones (UAA, UAG Y UGA). Dentro de los inhibidores de la traducción se encuentran la pactamicina, tetraciclina, pueromicina, cicloheximida y la toxina diftérica. El control de la traducción en eucariotas se produce a nivel del mRNA, en donde los mRNA específicos pueden secuestrarse mediante proteínas de unión al mRNA y otros son degradados rápidamente para que no persistan en fase inadecuada; otros de los mecanismos de control de la traducción es el de la fosforilación de varios factores de iniciación. Posteriormente esta cadena pasa al citosol y es traducida (Mathews y col., 2004). El control de la expresión genética y su alteración por la presencia de sustancias químicas, puede llevarse a cabo en los distintos pasos de la misma como es el control de la transcripción, la maduración, la traducción, postraduccional, etc., sin embargo el más importante es el control de la transcripción por ello se describió detalladamente.

## II. HIPÓTESIS

El anticonvulsivo fenitoína, induce alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central de embriones de pollo en el estadio 13.



### III. OBJETIVOS

#### III.1 General

Evaluar los efectos embriotóxicos de la fenitoína en la neurulación de embriones de pollo.

#### III.2 Específicos

Determinar la CL50 de la fenitoína mediante la aplicación de curvas dosis-respuesta.

Comparar los cambios fenotípicos inducidos por fenitoína contra las alteraciones espontáneas en el grupo control.

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 Materiales

Se trabajo empleando como material biológico embriones de pollo libres de patógenos de la empresa ALPES, usan o una incubadora incumatic 2000, estuche de disección para la extracción de los embriones, una micropipeta de 200 $\mu$ L y una de 1000 $\mu$ L, jeringas de 5ml para la extracción de clara de huevo, solución salina isotónica al 0.9%, ampolleta de fenitoína (Epamin) de la marca PFIZER, un estereoscopio y equipo para documentar las imágenes.

### IV.2 Métodos

Los embriones se mantuvieron a una temperatura de 18°C  $\pm$  2. Posteriormente se incubaron durante un periodo de 14 horas, a una temperatura constante de 37°C, manteniendo las condiciones de humedad relativa entre 60-70%. Después de las 14 horas se sacaron de la incubadora y se les hizo un orificio pequeño con la ayuda de una aguja. Una vez realizado el orificio se inocularon con la sustancia correspondiente a cada grupo con la ayuda de una micropipeta. Una vez terminada la inoculación fueron sellados los orificios con una cinta adhesiva, volviéndolos a incubar bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, para continuar con el desarrollo del embrión. El grupo control fue tratado igual solo que sin inocular.

Terminado el tiempo de 45.5 horas se sacaron de la incubadora, y se procedió a extraer el embrión del cascarón, con la ayuda de unas tijeras de disección. Se abrió el cascarón a aproximadamente la mitad cuidando de no romper la yema. Una vez abiertos los cascarones se facilita la exposición del embrión dentro del saco vitelino, posteriormente se disecciona con la ayuda de unas tijeras y unas pinzas con las que se sostendrá al embrión, mientras es cortado de una manera circular alrededor del saco vitelino El embrión diseccionado se introdujo en una solución salina isotónica y se observó en un estereomicroscopio. A los

embriones se les observó las diferencias fenotípicas y se reportaron las siguientes características: número de somitas, longitud cráneo-caudal, longitud y ancho de la porción craneal y la apertura del tubo neural, siendo comparadas contra el grupo control (García, 2005).

#### IV. 3 Diseño Experimental

Se trabajó con 4 grupos experimentales:

##### Grupo Control

En este grupo se observaron los cambios fenotípicos durante la neurulación de los embriones sin tratamiento.

##### Grupo con Tratamiento

Para ver los efectos de la fenitoína sobre el desarrollo del sistema nervioso se planearon 3 experimentos con cuatro grupos problemas, dichos grupos se mantuvieron a las mismas condiciones que el grupo control y fueron tratados con las siguientes concentraciones de fenitoína: La fenitoína utilizada se encontraba a una concentración de 250mg/5ml, a partir de la cual se inoculó de forma directa a el grupo 1, 13µl (65µg) que es la concentración normal terapéutica, al grupo 2, 130µl (650µg) correspondiente a 10 veces la dosis normal, y al grupo 3, 390µl (1950µg) correspondientes a 30 veces la dosis normal recomendada. Y en el grupo control no fue inoculado con fenitoína esto para comparar los efectos de la fenitoína entre los grupos tratados y el grupo control.

#### IV.4 Método Estadístico

La cantidad de embriones manejados permite utilizar un estadístico z para comprobar la proporción de las alteraciones en los grupos de tratamiento contra los controles y establecer la significancia de la respuesta.

$$Z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\hat{p} \hat{q} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Donde:

$p_1$  = Fracción de alterados en el grupo tratado

$p_2$  = Fracción de afectados en el grupo control

$p$  = Fracción total de afectados

$q$  = Fracción total de no afectados

$n_1$  = Población del grupo tratado

$n_2$  = Población del grupo control

Las partes funcionales de esta prueba estadística son:

El conjunto de hipótesis nula  $H_0$  ( $p_1=p_2$ ) y alternativa  $H_a$  ( $p_1 \neq p_2$ ).

El estadístico de la prueba.

La región de rechazo asociada.

La región de rechazo para la  $H_0$  con un nivel de error  $\alpha=0.05$  es  $z > 1.96$  (Mendenhall y col., 1994).

Al comparar los tratamientos con el grupo control, no se ve reflejado el comportamiento de los mismos con relación a las poblaciones iniciales, al ser utilizada la fórmula de Abbott podremos deducirlo (Ehab, 2002), con lo que se incluyen las alteraciones espontáneas en el grupo control.

Se corrigió el porcentaje de alteraciones con respecto al control utilizando la fórmula de Abbott. Esta fórmula es utilizada en algunos procedimientos generales donde se mide el efecto de sustancias químicas en grupos tratados y se compara contra grupos control.

La formula de Abbott es:

$$\% A = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} * 100$$

En donde:

% A = Porcentaje de alteración corregida

me= Alteración en el tratamiento

mb= Alteración en el control

## V. RESULTADOS.

Los grupos se conformaron con al menos 12 embriones y se repitieron tres veces para cada grupo experimental. Los resultados indicaron una media de  $14.66 \pm 0.33$  ee para el grupo control,  $12.66 \pm 1.45$  ee en embriones totales en el grupo 1,  $12 \pm 1.15$  ee de embriones totales para el grupo 2 y  $13.33 \pm 0.66$  ee de embriones totales para el grupo 3, de acuerdo a las dosis indicadas en la metodología.

Entre cada uno de los grupos se compararon los embriones normales obteniendo una media de  $11.33 \pm 0.66$  ee para el grupo control; para el grupo 1, la media fue  $9 \pm 1$  ee; en el grupo 2, la media fue de  $6.33 \pm 1.45$  ee y en el grupo 3, la media fue de  $3 \pm 0.57$  ee; al realizar el análisis estadístico se obtuvo una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados ( $p > 0.05$ ). La comparación entre cada grupo con respecto a los embriones normales, se presenta en la Figura 5. En la Figura 6 se presenta un embrión normal en el estadio 13 a 25X, observándose el desarrollo de los primordios óptico, ótico y cardíaco.

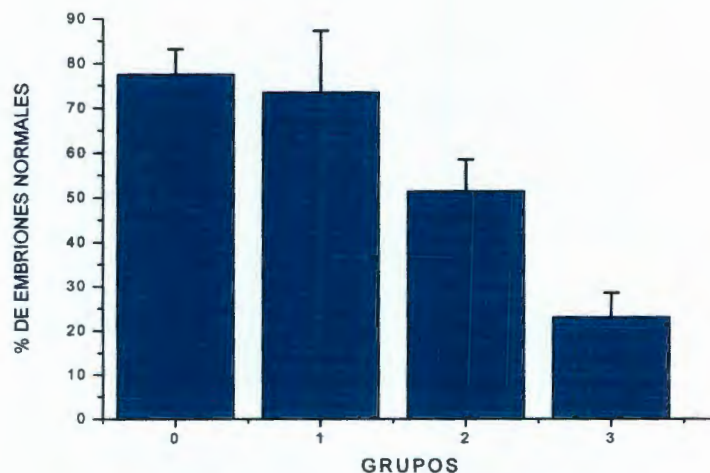


Figura 5. Grafica de Embriones Normales. En el eje de las abscisas se presentan las diferentes grupos (0, 1, 2 y 3) formados para cada una de las concentraciones ( $0\mu\text{g}$ ,  $65\mu\text{g}$ ,  $650\mu\text{g}$  y  $1950\mu\text{g}$ ) de fenitoína y en eje de las ordenadas el porcentaje de embriones normales para cada concentración.

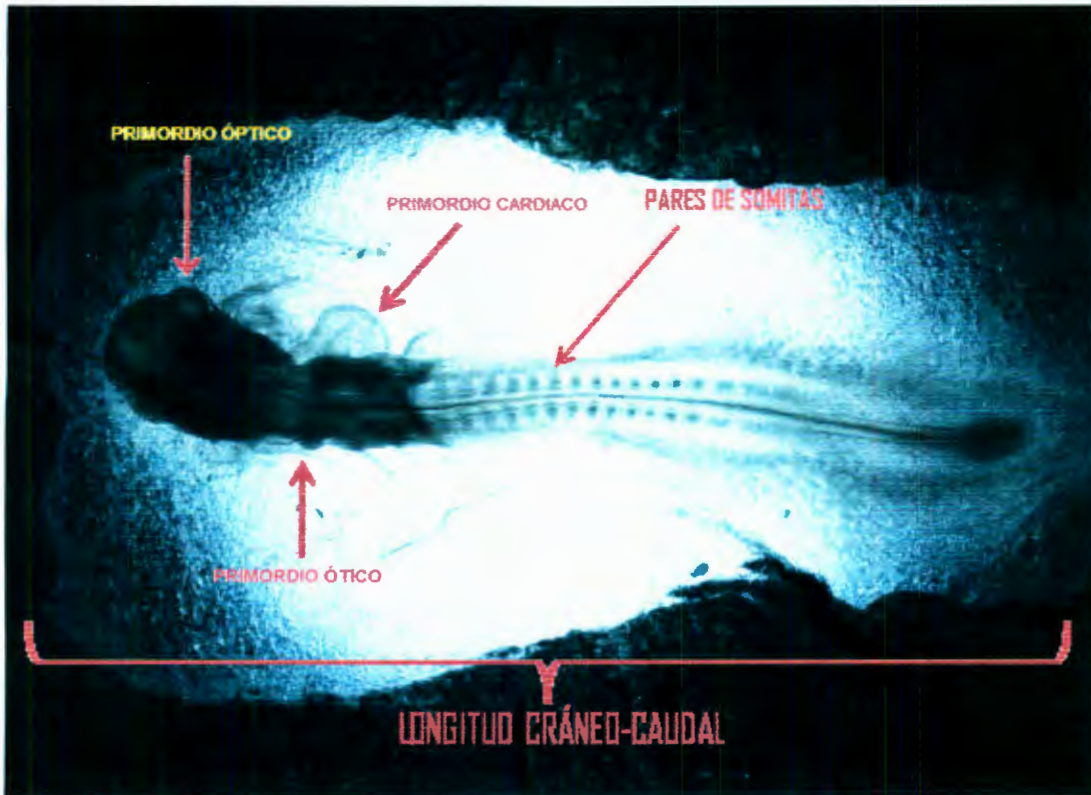


Figura 6. Embrión normal de ED 13 (25X). En la imagen se observan e indican los primordios cardíaco, óptico y ótico. En la figura también se pueden observar los pares de somitas y la longitud cráneo-caudal.

En cuanto a las aplasias observadas en cada grupo (Figura 7) se obtuvo una media de  $2 \pm 1$  ee en el grupo control, para el grupo 1 de  $1.33 \pm 0.66$  ee, en el grupo 2 de  $2.66 \pm 0.33$  ee y en grupo 3 una media de  $5.33 \pm 0.88$ ; dichos resultados presentan una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo 3, para el grupo 2 no se observa una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). En la Figura 8 se presenta una aplasia generalizada donde se puede observar la ausencia de primordios óptico, ótico y cardíaco.

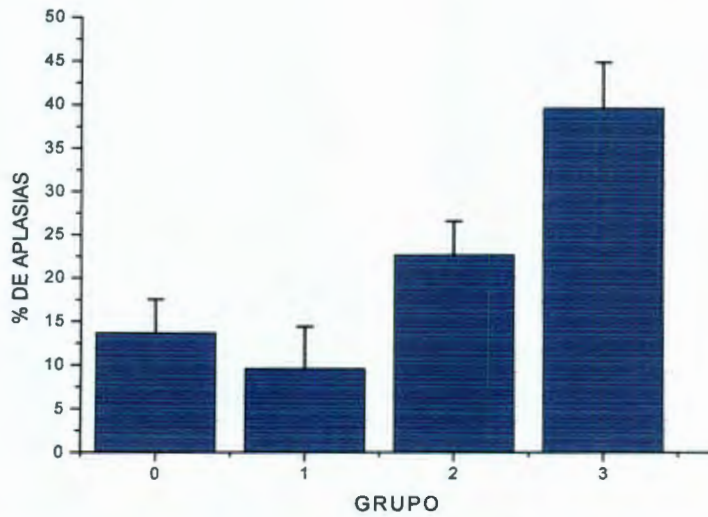


Figura 7. Grafica de Aplasia. En el eje de las abscisas se observan los diferentes grupos (0, 1, 2 y 3) formados para cada una de las concentraciones (0 $\mu$ g, 65 $\mu$ g, 650 $\mu$ g y 1950) de fenitoína y en eje de las ordenadas el porcentaje de embriones con aplasia para cada concentración.

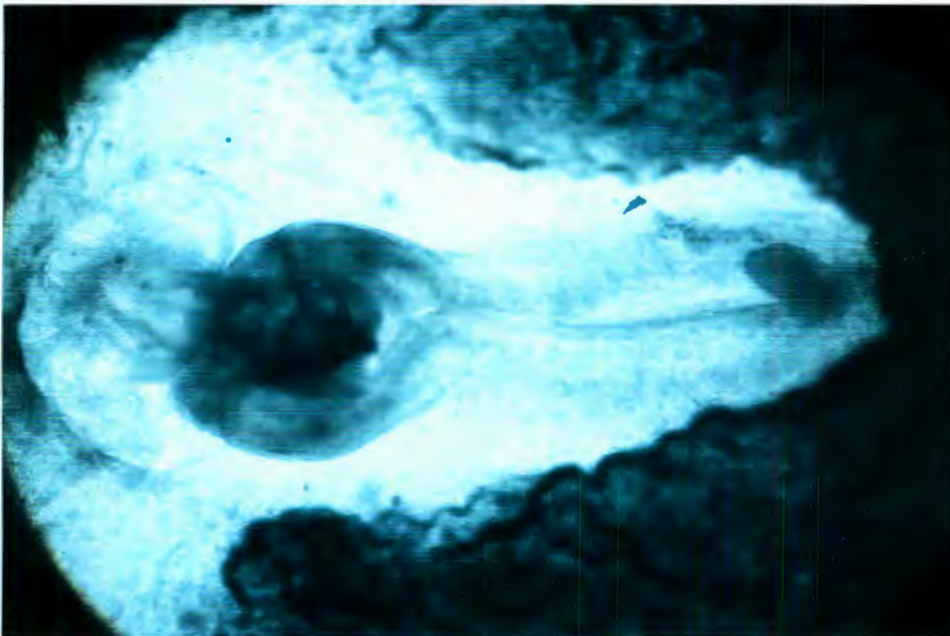


Figura 8. Aplasia generalizada. En la imagen se puede observar la ausencia de la formación de primordios cardíaco, óptico y ótico, con una disminución en la longitud cráneo-caudal, producto de la administración de fenitoína. Observándose también la ausencia en la formación de cabeza.



Las resorciones que como se mencionó antes representan la destrucción del embrión, se obtuvo una media de  $2 \pm 0.57$  ee. en los controles, para el grupo 1, fue de  $2.33 \pm 1.20$  ee, en el grupo 2, de  $3 \pm 0$  ee y en el grupo 3, fue de  $4 \pm 1.73$  ee, encontrándose una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados ( $p > 0.05$ ), Figura 9. Las resorciones se presentaron en todos los grupos, Figura 10.

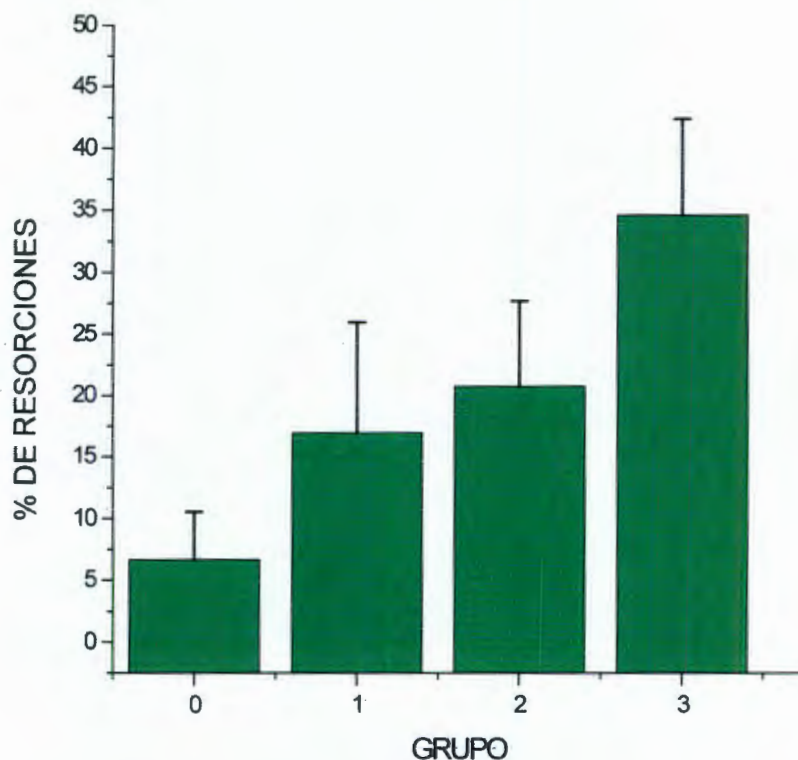


Figura 9. Grafica de Resorciones. En el eje de las abscisas diferentes se presentan los grupos (0, 1, 2 y 3) formados para cada una de las concentraciones ( $0\mu\text{g}$ ,  $65\mu\text{g}$ ,  $650\mu\text{g}$  y  $1950$ ) de fenitoína y en eje de las ordenadas el porcentaje de resorciones para cada concentración.

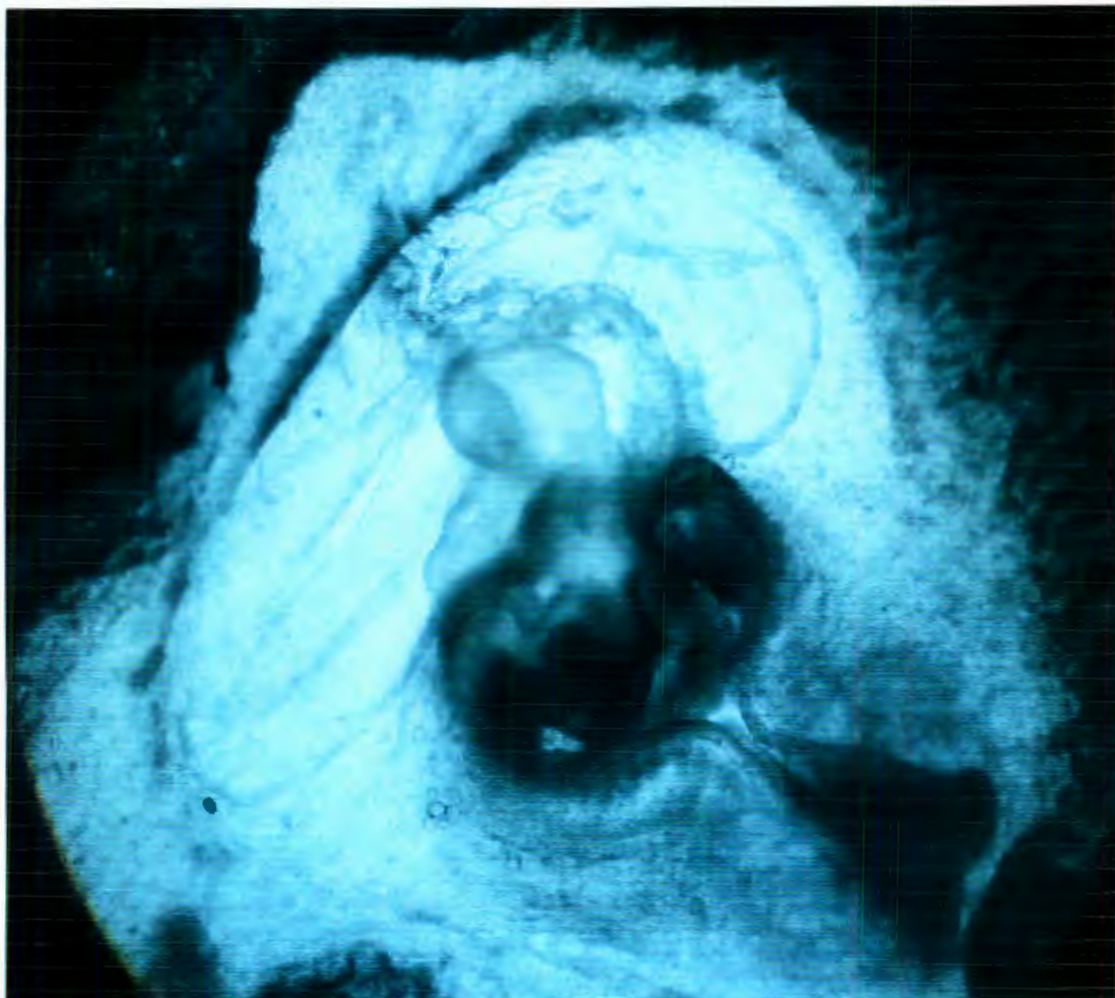


Figura 10. Resorción. Fotografías de resorciones producidas por la administración de fenitoína. En la cual se observa la deformación del embrión por completo.

También se analizó la suma de las anomalías más las resorciones obteniendo una media en cada grupo de  $3 \pm 0.57$  ee en el grupo control, en el grupo 1, de  $3.66 \pm 1.85$  ee, en el grupo 2, de  $5.33 \pm 0.66$  ee y el grupo 3, de  $10.33 \pm 1.20$  ee, observándose un incremento en el número de anomalías conforme se aumentaba la concentración de fenitoína, Figura 10, encontrándose una diferencia significativa entre los grupos 2 y 3 con respecto a los controles y para el grupo 1 no se observó una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

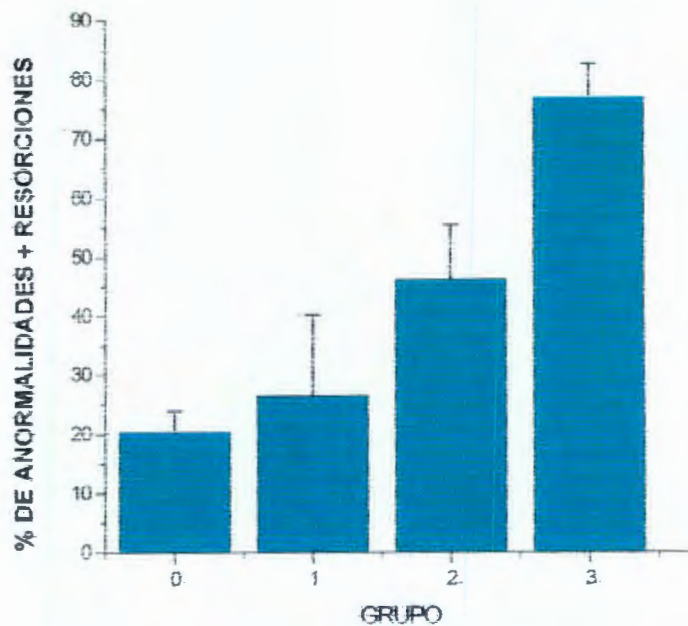


Figura 10. Grafica de Anormalidades más resorciones. En el eje de las diferentes grupos (0, 1, 2 y 3) formados para cada una de las concentraciones (0 $\mu$ g, 65 $\mu$ g, 650 $\mu$ g y 1950) de fenitoína y en eje de las ordenadas el porcentaje de anomalidades más resorciones para cada concentración.

Al comparar los resultados entre los grupos tratados con el grupo control, se observa que hay un incremento en las anomalidades conforme se va incrementando la dosis inoculada a cada grupo, tal es el caso en el aumento de resorciones y aplasias.

Al comparar los resultados de la relación dosis-respuesta se puede observar que es proporcional el aumento de malformaciones conforme se aumenta la dosis, y al realizar la corrección de Abbott para observar el comportamiento real de la población se ve el mismo efecto del aumento de malformaciones de acuerdo a la dosis, Figura 11.

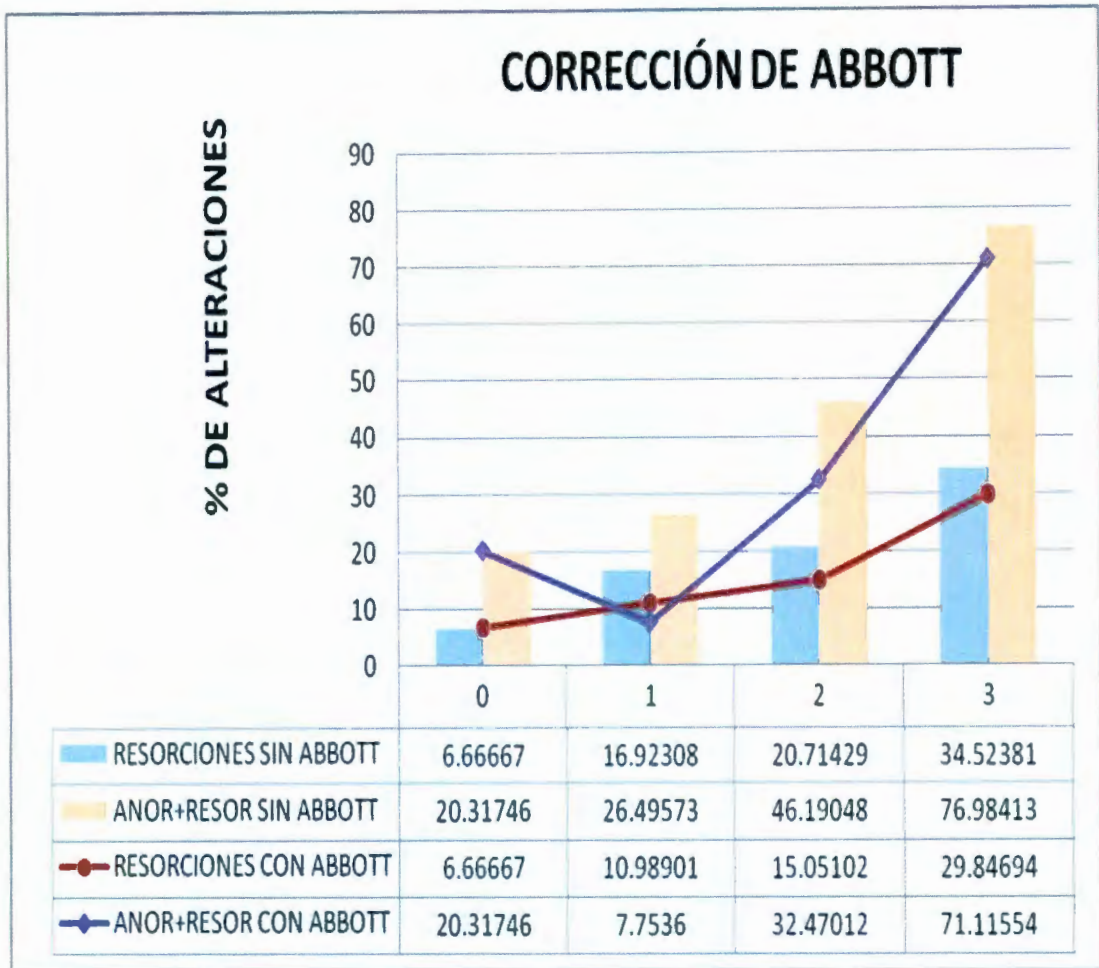


Figura 11. Gráfica de Relación Dosis-Respuesta. En la gráfica se presenta los porcentajes de alteraciones entre la dosis y el resultado obtenido, en donde se observa que las alteraciones aumentan conforme aumenta la dosis. Este efecto se observa aun cuando se aplica la corrección de Abbott.

Como se puede observar en la Figura 11, la concentración media (CL50) a la cual se produce el 50% de muertos en los grupos de estudio se dio en la concentración de 1950 µg.

## VI. DISCUSIÓN.

Los cambios que alteran el desarrollo del sistema nervioso se pueden dar en cuestión de horas por lo que al utilizar el modelo de embriones de pollo se nos proporciona información acerca de estos cambios por medio de las alteraciones fenotípicas, de acuerdo a lo reportado por Hamburger y Hamilton, 1951; estas alteraciones son debido a los efectos teratógenos que tienen algunas sustancias químicas sobre el desarrollo del embrión.

Las anomalías encontradas en el grupo control fue del 20.31%, estas anomalías se pueden explicar por medio de modificaciones en la expresión genética ocasionadas por mutaciones espontáneas, las cuales son producto de errores en la replicación del ADN; estos errores de replicación surgen por la aparición de tautómeros que producen un cambio de base; otra causa es el incorrecto apareamiento de las bases nitrogenadas, los cuales son corregidos y detectados por la ADN polimerasa III, sin embargo si esta enzima llega a fallar no se corrige el error, Dichos errores pueden ser ocasionados por despurinizaciones, las cuales ocasionan un rompimiento en el enlace glucosídico localizado entre la base y la desoxirribosa, perdiéndose así un residuo ya sea de adenina o guanina dando como resultado la aparición de sitios apuricos, que no se pueden aparear correctamente con su base correspondiente, y las desaminaciones de citosina la cual es convertida en uracilo, el cual se apareara con la adenina, produciendo la aparición de puntos calientes mutacionales.

También se pueden asociar con la metilación, que es capaz de modificar la expresión de un gen, influyendo así en la reorganización de la notocorda que ejerce un papel inductor en la formación de la placa neural que posteriormente formara el tubo neural. Teniendo como consecuencia las mutaciones espontáneas una duplicación en donde se adiciona un triplete o bien una delección donde se pierde un triplete; esta pérdida o ganancia puede producir enfermedades como el síndrome del X-frágil, la causa más común de retraso mental en varones (Griffiths y col, 2008). Considerando las razones antes

mencionadas este grupo fue utilizado para comparar los efectos de la fenitoína con los grupos tratados.

Los grupos tratados con fenitoína presentaron un incremento en las anomalías observadas dependiente de la dosis, estos efectos biológicos son producto de un intermediario reactivo producto del metabolismo de la fenitoína el cual es capaz de oxidar el ADN, produciéndose así rompimiento de doble cadena de ADN y la formación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, este rompimiento de cadenas es reparado mediante recombinación homóloga; sin embargo si aumentan los niveles de rompimiento de doble cadena se induce la hiper-recombinación, dando lugar a cambios genéticos deletéreos. Por lo que se sugiere que la recombinación de genes es por medio de conversión, pero sin estar asociada al cruzamiento (Winn y col., 2003).

La fenitoína produce genotoxicidad, teratogenicidad y embriotoxicidad por medio de dos mecanismos, en el primero produce embriotoxicidad, ocasionada por el fármaco como tal, esto debido a que se une a proteínas plasmáticas especialmente a albumina, atravesando la barrera hematoencefálica y placentaria, por lo que se encuentra en líquido cefalorraquídeo, plasma fetal y materno. Esto debido a que una vez absorbida se encuentra ionizado, siendo muy liposoluble (Guerrero y col., 1999; PLM, 2007; Martín-Calderón, 2001); y el segundo mecanismo está determinado por las enzimas metabólicas de la fase I y II. Ya que la fenitoína es metabolizada en hígado, produciendo un metabolito reactivo conocido como óxido de arene el cual es capaz de producir genotoxicidad y teratogenicidad, alterando la expresión genética que se ve reflejado en la aparición de malformaciones.

Los resultados de este trabajo pueden ser ocasionados por dos mecanismos, uno de los cuales es producido por el fármaco como tal el cual al atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria tiene efectos embriotóxicos. Y el segundo es causado por las enzimas metabólicas de la fase I y II, que al momento de metabolizar la fenitoína producen un compuesto denominado óxido de arene y especies reactivas del oxígeno que inducen la oxidación del ADN,

produciendo genotoxicidad y teratogenicidad (Barcellona y col., 1987; Winn y col., 2003).

Los resultados obtenidos presentan una diferencia estadística para las dosis altas que concuerdan con lo reportado por Fritz y col., 1976; Barcellona y col., 1987; Hansen y col., 1992 y 1988; y Kim y col., 1997; esto debido a que la fenitoína por si sola puede producir embriotoxicidad, la cual puede ser explicada en base a su liposolubilidad y unión a albumina, ya que los huevos en su mayoría están conformados por albumina y lípidos, lo que determinara su absorción, otra de las posibles explicaciones es que atraviesa barrera hematoencefálica, por lo que al sumarse estos tres factores se potencial la embriotoxicidad de la fenitoína.

Sin embargo difieren con Eluma y col., 1984; Miranda y col., 1994; Ozolins y col., 1995; una probable explicación a este comportamiento es que en los embriones de pollo no se tiene un sistema de activación metabólica para llevar a cabo la modificación química de la fenitoína, como en el caso de los animales utilizados en los experimentos como son el ratón, la rata y el hámster, en donde la fenitoína era metabolizada por las enzimas metabólicas de la fase I y II, produciendo un metabolito reactivo denominado óxido de arene, el cual sumado a los tres factores mencionados anteriormente, produce genotoxicidad y teratogénicidad con lo se eleva aún mas los efectos de la fenitoína aún cuando la dosis suministrada sea la dosis terapéutica. Por este motivo no se presentaron malformaciones con diferencias significativas con el grupo control y el grupo 1 al cual se le aplico una concentración de 65 µg (dosis terapéutica), en los embriones de pollo ya que carecen de este sistema metabólico.

En el grupo de 650 µg y 1950 µg de fenitoína, se tuvo un incremento tanto para las anomalías como para las resorciones, siendo más pronunciado para el segundo grupo, estos resultados sugieren que los efectos son producidos por la droga como tal y son de tipo embriotóxico, debido a que los embriones de pollo no cuentan con un sistema activador que metabolice la fenitoína a un intermediario que produzca alteraciones en la expresión genética. Por lo que los

efectos dependen de la dosis (Barcellona y col., 1987). Para la concentración de 1950  $\mu\text{g}$  se observó el efecto de la concentración letal media, debido a que fue la concentración donde se muere la mitad de mi población.



## VII. CONCLUSIONES.

1. Los embriones de pollo son un modelo sensible para el estudio de los efectos embriotóxicos durante el desarrollo del sistema nervioso.
2. La fenitoína induce diferencias significativas en aplasias respecto al grupo control.
3. Al comparar las resorciones el grupo control y los tratados con fenitoína se encontró diferencia significativa.
4. Es importante complementar este estudio en otro modelo en el que participen las enzimas hepáticas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams J, Vorhees CV, Middaugh LD. 1990.** Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. *Regulatory Neurotoxicology and teratology.* May-Jun; 12(3):203-14.
- Avaria, M A. 2005.** Aspectos Biológicos del Desarrollo Psicomotor, *Revista Pediátrica Electrónica* 4(1):36-46
- Barcellona PS, Barale R, Campana A, Zucconi D, Rossi V, Caranti S. 1987.** Correlations between embryotoxic and genotoxic effects of phenytoin in mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* Vol. 7(2):159-68.
- Beekhuijzen ME, Verhoef A, Klaassen R, Rompelberg CJ, Piersma AH. 2000.** Comparison of in vitro and in vivo developmental toxicity and pharmacokinetics of phenytoin in the rat. *Toxicology and Pharmacology.*: Vol. 87(2):96-102.
- Belmont-Gómez A, López Ugalde V, Rodríguez Palomares C, Kunhardt-Rasch J. 1996.** Seguridad de la Lactancia en Hijos de Mujeres que Reciben Fenitoína. *Perinatología y Reproducción Humana.*: Vol 10:169-176.
- Chaves A. 2006.** <http://teoricodeneuro.blogspot.com/2006/04/neurulacion.html>
- Copp A. J. 2005.** Neurulation in the cranial region – normal and abnormal. *Journal Anatomy.* Vol 207:623–635
- Duley L, H-S D. 2006.** Sulfato de magnesio versus fenitoína para la eclampsia. *Revisión Cochrane traducida.*: Vol 4.
- Doumet A M.**  
[http://www.ucsg.edu.ec/catolica/secundarias/html/facultad\\_medicina/carrera\\_medicina/tutoria/materias/embriologia/datos/embriologia3.htm](http://www.ucsg.edu.ec/catolica/secundarias/html/facultad_medicina/carrera_medicina/tutoria/materias/embriologia/datos/embriologia3.htm)
- Ehab B.2002.** <http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm>
- Eluma, FO y colSucheston ME, Hayes TG, Paulson RB. 1984.** Teratogenic effects of dosage levels and time of administration of carbamazepine, sodium valproate, and diphenylhydantoin on craniofacial development in the CD-1 mouse fetus. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology.* 1984; 4(3):191-210.
- Flores, J., Armijo, J.A., Mediavilla A. 1998.** *Farmacología Humana*, 3era ed., Masson, S.A., España: 499-501.

- Fort DJ, Bantle JA, 1988.** Use of Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus and an exogenous metabolic activation system to evaluate the developmental toxicity of diphenylhydantoin. *Fundamental and Applied Toxicology*. May; 14(4):720-33.
- Fritz H, Muller D, Hess R. 1976.** Comparative study of the teratogenicity of phenobarbitone, diphenylhydantoin and carbamazepine in mice. *Toxicology*. Nov-Dec;6(3):323-30.
- García, D.G. 2005,** Implementación del modelo de embriones de pollo para el estudio del efecto de sustancias químicas durante la neurulación (el caso de progesterona). Santiago de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 26, 27.
- Garza, M S. 2004.** Atlas De Síndromes Epilépticos, ARMSTRONG Laboratorios de México S.A. de CV. México DF: 7-10, 17-113
- Gos M, Szpecht-Potocka A. 2002,** Genetic basis of neural tube defects. I. Regulatory genes for the neurulation process. *Journal of Applied Genetics*. 43(3):343-350
- Griffiths A J F, Miller J H, Suzuki D T, Lewontin R C y Gelbart W M. 2008.** *Genética*, Séptima Edición, Editorial Mc Graw Hill.
- Guerrero G FJ, Rull JV, Rodriguez Pérez FJ. 1999.** <http://tratado.uninet.edu/c100305.html>
- Hamburguer V. and Hamilton H. L. 1951.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Morphol*: 88: 49-92.
- Hansen DK, Branham WS, Sheehan DM, Holson RR. 1992.** Embryotoxicity of phenytoin in adrenalectomized CD-1 mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*.: vol 199(4):501-8.
- Kim P M, Winn LM, Parman T, Wells PG. 1997.** UDP-glucuronosyltransferase-mediated protection against in vitro DNA oxidation and micronucleus formation initiated by phenytoin and its embryotoxic metabolite 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Ther*. Jan; Vol 280(1):200-9.
- López H E, Bravo J, Solís H. 2005.** Epilepsia y Antiepilépticos de Primera y Segunda Generación. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, Vol. 48(5):201-209.

**Martín-Calderón, J.L., Varona, J., Espina, L.M. 2001.** Monitorización de niveles plasmáticos de fenitoína. *Revista de Diagnóstico Biológico*. Vol. 50(2).

**Mathews CK., y col. 2004.** *Bioquímica*, 3era ed., Pearson Addison-Wesley, España: 1225-1232, 1235-1242.

**Mendenhall W., Wackerly D y Scheaffer R. 1994.** *Estadística Matemática con Aplicaciones*. 2da. ed. Grupo editorial iberoamericana. México: 399-440.

**Miranda AF, Wiley MJ, Wells PG. 1994.** Evidence for embryonic peroxidase-catalyzed bioactivation and glutathione-dependent cytoprotection in phenytoin teratogenicity: modulation by eicosatetraenoic acid and buthionine sulfoximine in murine embryo culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*.: Vol 124(2):230-41.

**Ozolins TR, Wiley MJ, Wells PG. 1995.** Phenytoin covalent binding and embryopathy in mouse embryos co-cultured with maternal hepatocytes from mouse, rat, and rabbit. *Comparative Biochemistry and Pharmacology*.: Vol 50(11):1831-40.

**PLM. 2007.** *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Edición 53. Thomson. <http://www.thomsonplm.com/PLMWeb/info/>

**Rebordosa S y Aguilera C. 2004.** Seguridad de los fármacos antiepilépticos durante el embarazo. *Medicina Clínica*.: Vol. 122(17):675 – 676

**Sadler, T.W. 2005.** *Langman's Medical Embryology*. 9na. ed. Lippincott Williams & Wilkins. E.U.A.:444-448.

**Troncoso L, Pedro Menéndez G P, Hernández Ch M. 2001.** Convulsiones neonatales: diagnóstico y manejo. *Revista chilena de pediatría*.: Vol. 72: No3.

**Winn Louise M, Perry M. Kim, Jac A. Nickoloff. 2003.** Oxidative Stress-Induced Homologous Recombination As A Novel Mechanism For Phenytoin-Initiated Toxicity. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. Vol. 306(2):523–527.

**Yu, W. K., Wells P.G. 1995.** Evidence for lipoxygenase-catalyzed bioactivation of phenytoin to a teratogenic reactive intermediate: in vitro studies using linoleic acid-dependent soybean lipoxygenase, and in vivo studies using pregnant CD-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 131(1):1-12.