



Embrioprotección por ácido fólico en ratas SHR tratadas con nifedipino

Chirino Galindo Gladys¹, Delgado Contreras Fernando², González Ríos Axel Rubén², Liera Carranza René², Palomar Morales Martín¹.

¹Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Metabolismo de la Diabetes Mellitus, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, C.P. 54090. Tlalneptla, Estado de México.

²Universidad Nacional Autónoma de México. Módulo de Metodología Científica, Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalneptla, C.P. 54090. Estado de México.

* Autor para correspondencia: gchirinog@hotmail.com

Recibido:

19/abril/2016

Aceptado:

16/agosto/2016

Palabras clave

Teratogénesis, nifedipino, ratas SHR

Keywords

Teratogenesis, nifedipine, SHR rats

RESUMEN

El nifedipino es un fármaco antihipertensivo que a veces es suministrado a mujeres en etapa gestacional con hipertensión, aunque presenta un posible riesgo teratogénico. Se sabe que el ácido fólico puede ayudar a un mejor pronóstico de la gestación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ácido fólico sobre las malformaciones causadas por el nifedipino durante el desarrollo embrionario de rata SHR. Se utilizaron 16 ratas SHR hembras, asignadas a 4 grupos, que fueron tratados respectivamente con nifedipino, ácido fólico, nifedipino más ácido fólico, o vehículo. Al día 11.5 de gestación, las ratas fueron sacrificadas y los fetos fueron analizados para malformaciones. Se observó que el nifedipino produce una elevada tasa de malformaciones, también observadas en el grupo que recibió vehículo; y que el ácido fólico revierte el daño en ambos casos. Se concluye que el ácido fólico puede prevenir las malformaciones que el nifedipino causa.

ABSTRACT

Nifedipine is an antihypertensive drug that sometimes is prescribed to pregnant women with high blood pressure, although it presents a possible teratogenic risk. It is largely known that folic acid could help to ameliorate pregnancy prognostic. The objective of this study was to assess whether folic acid can prevent malformations caused by nifedipine in SHR rat embryo development. Sixteen SHR female rats were randomly assigned to 4 groups, which were treated respectively with nifedipine, folic acid, folic acid plus nifedipine, or vehicle. At day 11.5 of gestation, rats were sacrificed, and the fetuses were obtained and analyzed for malformations. It was observed that nifedipine produced a high rate of malformations, which were also observed in the group that received vehicle; and that folic acid reverses damage in both cases. The main conclusion is that folic acid could prevent the malformations caused by nifedipine without affect hypertension.



Introducción

Se define como teratogénesis o dismorfogénesis a la alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo, y que es detectada durante la gestación, en el nacimiento o con posterioridad. Un teratógeno es un agente capaz de causar un defecto congénito, y puede ser un factor ambiental o químico. Entre los químicos se encuentran los fármacos que son recetados a mujeres en gestación, siendo estos contraindicados para su uso durante ésta etapa, ya que manifiestan un mayor riesgo de que el neonato nazca con alguna malformación. Los efectos de un agente teratógeno se pueden manifestar en forma de aborto espontáneo u óbito, retraso del desarrollo intrauterino, defectos anatómicos, tumores, alteraciones funcionales de órganos sensoriales y sistema nervioso central (Pagano, 1991), y generalmente se detectan al momento del nacimiento (excepto aborto y óbito). Cualquier fármaco que cause bradicardia o arritmia en el embrión es potencialmente peligroso en el embarazo (Abela et al., 2010).

La hipertensión arterial es una complicación frecuente durante el embarazo, ya que afecta entre 40% y el 70% de las mujeres en este estado; cuando no se trata puede causar daños en el cerebro, el corazón, los vasos sanguíneos, los riñones y otras partes del cuerpo, acarreando importantes riesgos para la madre y el feto, y constituye una de las principales causas de mortalidad fetomaterna en el mundo; es la primera causa de muerte materna en los países desarrollados y la tercera en los países en vías de desarrollo, además de aumentar el riesgo de infarto cardiaco, apoplejía, insuficiencia cardíaca y renal, pérdida de la visión y otros problemas (Hernández, 2009), así como afecciones fetales como la restricción de crecimiento intrauterino (Voto, 2008).

El nifedipino (o nifedipina) es un fármaco antihipertensivo que pertenece a los medicamentos bloqueadores de los canales de calcio, gracias a lo cual inhibe el mecanismo contráctil de las células vasculares con la consiguiente vasodilatación de las arterias coronarias y los vasos periféricos. Se usa para tratar la presión arterial alta y controlar la angina de pecho, en dosis de 10-30 mg al día por vía oral. La Food and Drugs Administration (FDA) de los EUA, clasifica su potencial teratógeno en la categoría C, lo que indica un posible riesgo para el desarrollo embrionario, pero por negligencia o desconocimiento médico aún es suministrado a mujeres en etapa gestacional que padecen de problemas de hipertensión arterial (FDA, 2015).

El nifedipino causa reducción de la fuerza de contracción cardiaca en dosis de 7.2-28.8 μM a embriones de conejo de 13 días de gestación *in vitro* (Abela, et al., 2010); en embrión de rata en cultivo, a dosis de 1 μM produce deterioro severo de la función cardiaca por efecto antrópico negativo, reduciendo contracción de aurículas y ventrículos en el corazón (Nilsson, et al., 2012). En conejo, es teratogénico a dosis de 40 a 100 μmol de peso por día (Danielson et al., 1989).

Por otra parte, se sabe desde hace mucho tiempo que el ácido fólico es un factor que puede ayudar a un desarrollo embrionario exitoso (Hibbard y Smithells, 1965), si bien hay pocos estudios que respalden su beneficencia en condiciones adversas experimentales. Recientemente, se observó que el ácido fólico administrado a ratas preñadas tratadas con ácido valproico (un anticonvulsivo con poder teratogénico potente), reduce las malformaciones causadas por éste fármaco sobre tubo neural y sistema óseo (Aluclu et al., 2009); y que la administración de ácido fólico a ratonas diabéticas gestantes reduce las malformaciones de cierre de tubo neural y de sistemas cardiaco y esquelético causadas por el estado diabético (Oyama et al., 2009).

El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar si el ácido fólico es capaz de revertir o prevenir las malformaciones que el nifedipino produce sobre el desarrollo embrionario. Para este fin, se utilizaron ratas de la cepa SHR (spontaneously hypertensive rat), que presentan hipertensión en la etapa adulta, lo que representa un modelo fiable, además que en general la rata tiene un sistema inmune similar al de los seres humanos, un breve periodo gestacional (20-21 días), es de fácil manejo y con un genoma muy similar al de nuestra especie (Rivera et al., 2013).

Metodología

Reactivos

El ácido fólico fue obtenido en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en presentación de comprimidos de 4 mg de ácido fólico. El nifedipino se compró en una farmacia local, en presentación de capsulas con 10 mg del fármaco, bajo el nombre comercial de Cordilab®, Tecnofarma S.A. de C.V. Los demás reactivos utilizados fueron de las marcas Sigma Chemical Co, Merck, o J.T. Baker, y se obtuvieron en el Módulo de Metodología Científica III.

Obtención de material biológico

Se obtuvieron de la División de Investigación y Posgrado de la FES Iztacala 16 ratas de la cepa SHR, hembras, vírgenes, sexualmente maduras, de 12 a 14 semanas de edad, con un peso de 150 a 200 g, que se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a temperatura de 22-24 °C, con humedad ambiental del 50-60%, con ciclos luz: oscuridad de 12:12, iniciando a las 8:00 AM, con agua y alimento (LabDiet 5010) ad libitum. Todos los procedimientos realizados con los sujetos experimentales se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité de bioterio de la Facultad.

Apareamiento y frotis

Las ratas hembra se aparearon con machos sanos, fértiles, de 250 a 300 g de peso, de la misma cepa, por el método de trio, y al día siguiente se realizó un frotis vaginal, para observar al microscopio la presencia de espermatozoides; cuando el frotis resultó positivo se consideró como día cero de la gestación (Erb, 2006).

Tratamientos

Las ratas preñadas se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro tratamientos experimentales de 4 individuos cada uno. Un grupo fue tratado con nifedipino a dosis de 2 mg/Kg (Cheng et al., 2014), por vía oral, los días 8 a 10 de gestación; otro grupo fue tratado con ácido fólico a dosis de 2.5 mg/kg (Oyama et al., 2009), desde el día 0 hasta el 11 de gestación; y al último grupo se le administraron tanto el nifedipino como el ácido fólico, a las mismas dosis, como se describió para cada uno de los dos grupos anteriores; al grupo restante se le administró agua de beber (el vehículo de los fármacos), los días mencionados, y fue considerado como el grupo testigo o control. De cada sujeto se registró el peso corporal diariamente, y el día del sacrificio se midió la presión arterial sistólica y diastólica en un pletismógrafo Panlad s.l., LE 5007, y los datos fueron registrados en el programa de cómputo PowerLab.

Obtención de embriones

El día 11.5 de gestación, las hembras preñadas se anestesiaron con pentobarbital sódico a dosis de 100 mg/Kg, y antes de la muerte cardiaca se realizó una laparotomía. Se obtuvieron el útero y los ovarios, que se enjuagaron en solución salina en frío antes de continuar el procedimiento. Se registró el número de embriones y cuerpos lúteos de los ovarios de cada rata con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6. El útero se abrió, y se extrajeron los embriones, los cuales se revisaron cuidadosamente para tratar de detectar

malformaciones, y se registró la presencia de reabsorciones (tejido amorfo sanguinolento).

Índice de implantación

Se obtuvo a partir del cociente del número de implantaciones sobre el número de cuerpos lúteos, como una medida de la eficiencia reproductiva; ya que un fármaco o extracto que causa una pérdida de implantación mayor al 50% no es considerado teratogénico sino tóxico (Erb, 2006).

Score morfológico

Los embriones se observaron al microscopio estereoscópico Leica y se tomaron imágenes fotográficas con una cámara Moticam 5.0, en las cuales se interpretó el score o marcador morfológico, que es una manera de asignar valores numéricos a diferentes estructuras del embrión (Brown y Fabro, 1981).

Análisis histológico

Los embriones se fijaron en formol al 10%, por 24 h. Posteriormente fueron deshidratados, aclarados, embebidos e incluidos en parafina grado histológico; los tejidos en los bloques fueron cortados a 5-6 μm en un micrótopo de rotación Leica 2125RTS, y las secciones obtenidas fueron colocadas en portaobjetos de vidrio, con gelatina histológica, y posteriormente se tiñeron por el método de rutina H-E. Las laminillas se observaron en un microscopio óptico Leica DM500, acoplado a una cámara fotográfica Leica ES3, se tomaron fotografías y se interpretaron éstas.

Análisis estadístico

Los resultados paramétricos se analizaron por medio de la prueba de ANOVA de dos factores. Cuando fue necesario, se aplicó la prueba de LSD. Los resultados no paramétricos se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis (Daniel, 2007). Se utilizó el paquete estadístico SAS 10.0.

Resultados y discusión

Presión arterial

La presión arterial sistólica y diastólica de ratas tratadas con los diferentes esquemas se observa en la figura 1. Tanto para la presión sistólica como para la diastólica, el tratamiento con nifedipino (con o sin ácido fólico), induce una disminución con respecto al control; mientras que en el grupo tratado solamente con ácido fólico, la presión arterial no es estadísticamente diferente a la del grupo control, lo que corrobora entonces el efecto antihipertensor del nifedipino.

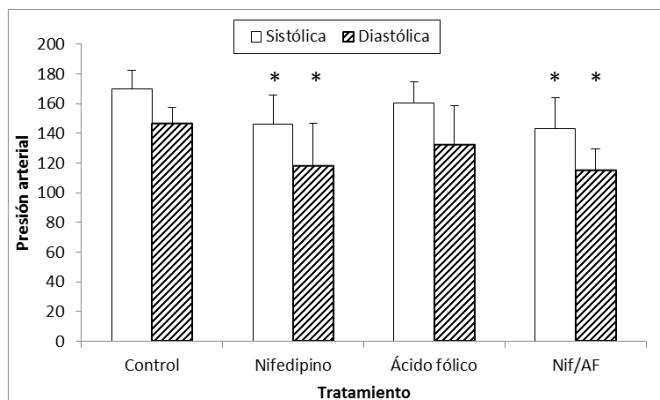


Figura 1. Presión arterial diastólica y sistólica de ratas SHR hembras con 11.5 días de gestación, sometidas a tratamiento con nifedipino o ácido fólico. Promedio \pm desviación estándar de 4 sujetos por grupo. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control (ANOVA bifactorial).

Peso corporal

Con respecto al peso de las ratas preñadas sometidas a los distintos tratamientos, ninguno de los tres tratamientos afecta la ganancia de peso a lo largo del experimento (Figura 2), lo que cabe esperar, ya que no se ha reportado que el nifedipino o el ácido fólico causen efecto sobre el peso corporal, o sobre la ganancia de peso que se presenta en las hembras en la gestación.

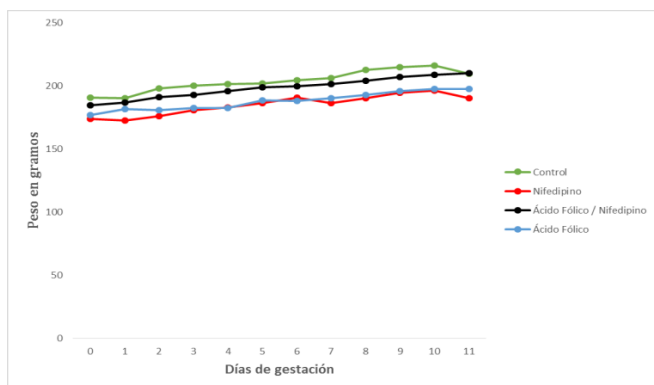


Figura 2. Peso de ratas preñadas desde el día de inicio de la preñez hasta el día de sacrificio. Por claridad, se omitieron las barras de desviación estándar (menores al 5%), y se grafica sólo el promedio de 4 sujetos experimentales. No hay diferencias entre grupos.

Porcentaje de implantación

En cuanto a los parámetros reproductivos, el porcentaje de implantación, es muy bajo para el grupo control, y mejora un poco (no diferente estadísticamente) en el grupo tratado con nifedipino; mientras que la administración de ácido fólico causa un aumento

sustancial en el porcentaje de implantación, tanto para las ratas que sólo recibieron ácido fólico como para aquellas que estuvieron sometidas a nifedipino (Figura 3). Estos resultados comprueban que el nifedipino no es tóxico sobre el embrión sino que tiene potencial teratógeno. Por otra parte, comprueban que el ácido fólico tiene poder para restaurar el daño embrionario, sin afectar la presión arterial.

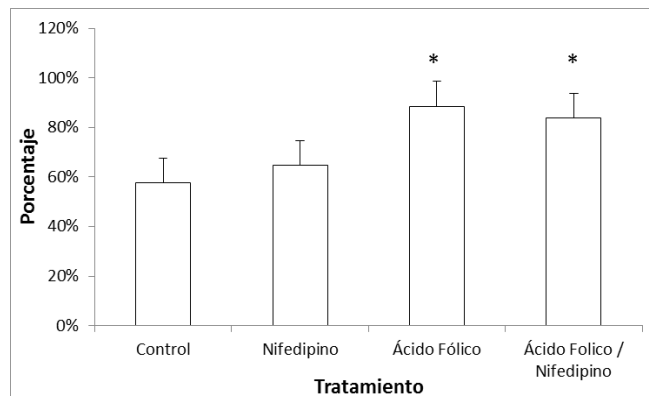


Figura 3. Porcentaje de implantación en ratas tratadas con nifedipino y ácido fólico. Promedio \pm desviación estándar de 4 camadas. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control (ANOVA bifactorial).

Además, las ratas tratadas con nifedipino tuvieron un elevado índice de reabsorciones ($30.05 \pm 9.93\%$), mientras que las ratas del grupo control y las sometidas a ácido fólico (con y sin nifedipino) no mostraron ninguna reabsorción; este resultado es estadísticamente significativo ($P < 0.001$ entre el grupo tratado con nifedipino y el control, por prueba de Kruskal-Wallis).

De acuerdo a Ahokas y Sibai (1990), existe una correlación negativa entre presión arterial sistólica y tamaño de camada: es decir, que una alta presión arterial sistólica se correlaciona con un tamaño de camada mayor, por lo cual se trató de encontrar una relación entre ambos parámetros, como se observa en la figura 4. El resultado obtenido mediante análisis matemáticos ($r = -0.544$) indica que hay una correlación moderada (Daniel, 2007) entre presión arterial y tamaño de camada. Sin embargo, considerando la condición materna, es probable que haya muchos más factores metabólicos, endócrinos y fisiológicos no considerados en este trabajo, que influyan en el desarrollo fetal.

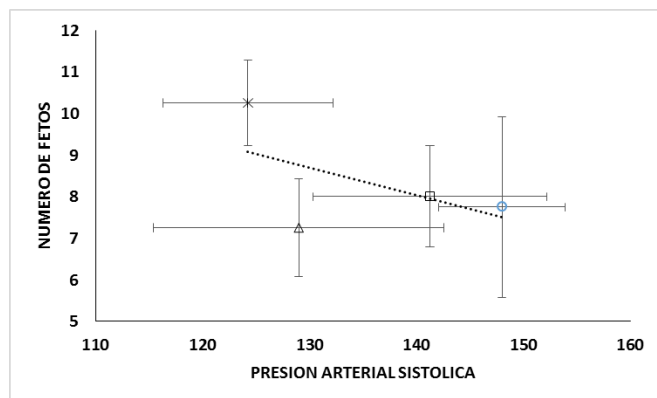


Figura 4. Correlación entre la presión arterial sistólica y el tamaño de camada; para ambos parámetros se grafica el promedio \pm el error estándar de 4 determinaciones. Control \circ ; nifedipino Δ ; ácido fólico \square ; ácido fólico más nifedipino \times .

Malformaciones embrionarias

Los embriones del grupo control presentaron retraso en el desarrollo del primordio cardíaco, desarrollo de cabeza/cerebro y en somitas, tal como lo demuestran Grollman y Grollman. (1962). Las alteraciones en el organismo materno pueden ser responsables de este tipo de trastornos, lo que podría a su vez, provocar hipertensión en su descendencia.

Estos resultados son lógicos, ya que se sabe desde hace varios años que en esta cepa de ratas, se ven alterados varios parámetros reproductivos y del desarrollo, como son el tamaño de camada (Ahokas y Sibai, 1990), el número y peso fetal, la mortalidad prenatal y el índice del desarrollo (Peracoli et al., 2001).

Por otra parte, el tratamiento con nifedipino, además de causar reabsorciones, se relaciona también con aparición de malformaciones (Figura 5); las cuales no se observan en los embriones de las ratas sin tratamiento, o en las sometidas a ácido fólico (con o sin nifedipino). Tomados en conjunto, los datos de las figuras 3, 4 y 5 indican que el nifedipino, a la dosis empleada en este trabajo, es un teratógeno potente.

Esto está en concordancia con lo reportado por Nilsson et al. (2012), quienes demuestran que hubo un severo deterioro de funciones cardíacas embrionarias debido al efecto inotrópico negativo. Asimismo infirieron que los fármacos que actúan directamente sobre canales iónicos o funciones cardiovasculares, causan teratogénesis en mayor o menor medida. Abela, et al. (2010) registraron

un retraso en el desarrollo general de embriones en cultivo in vitro, a mayores concentraciones de nifedipino (14.4 y 28.8 μM); mientras que a concentraciones más bajas (7.2 μM), los embriones presentaron insuficiencia cardíaca, falta de circulación sanguínea y fibrilación auricular-ventricular. El nifedipino, a través de la alteración de las propiedades de los canales de calcio, pueda causar hipoxia, la que a su vez, es la responsable de las malformaciones, el retraso del desarrollo y la muerte embrionaria, evaluado en éste trabajo como reabsorciones, el análogo en roedores de las malformaciones (Abela et al., 2010). Los resultados presentados aquí están en concordancia con esta hipótesis.

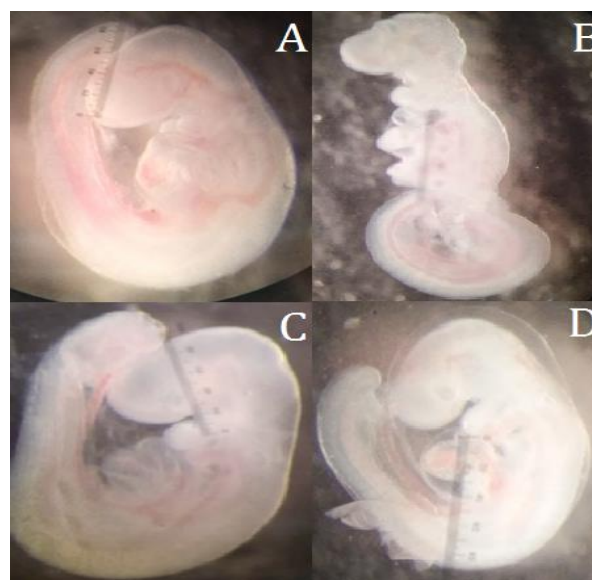


Figura 5. Embriones de 11.5 días de ratas hembra sometidas a distintos tratamientos. A: control; B: nifedipino; C: ácido fólico; D: ácido fólico más nifedipino. Se observa que el tratamiento con nifedipino causa una severa dismorfogénesis, mientras que la administración de ácido fólico sin nifedipino no afecta el desarrollo, y el tratamiento con ácido fólico revierte los daños que causa el nifedipino.

Score morfológico

A los embriones recuperados se les asignó un valor numérico de acuerdo a su grado de desarrollo, el que se muestra en la figura 6. Se puede observar que el tratamiento con nifedipino reduce el valor de éste score, mientras que el tratamiento con ácido fólico lo mejora, de manera significativa.

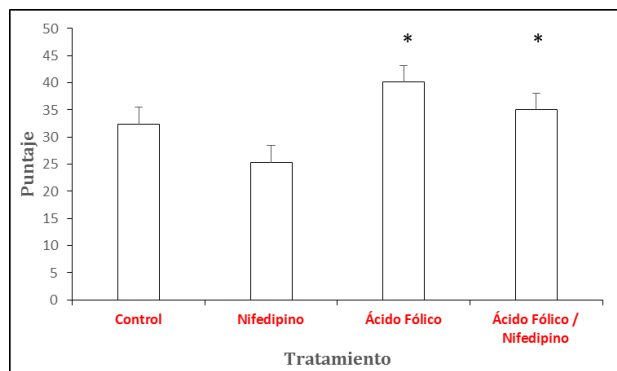


Figura 6. Score o registro morfológico de los embriones de 11.5 días de desarrollo de hembras SHR sometidas a distintos tratamientos. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control (prueba de Kruskal-Wallis) con respecto al grupo control.

Valoración histológica

En los cortes histológicos, se observa que efectivamente el nifedipino altera los procesos de desarrollo embrionario que involucran formación del primordio cardiaco (Figura 7). Se aprecia que en los embriones de ratas tratadas con nifedipino, el ventrículo y la aurícula primitivos no están completamente desarrollados en todos los casos (Figura 7B); mientras que en los embriones de rata tratadas con ácido fólico más nifedipino, se ha desarrollado por completo el tubo cardiaco, y se alcanzan a distinguir ambas cavidades, además de que se esbozan las comunicaciones atrioventriculares a cada lado del mismo (Figura 7D).

En cuanto a los procesos de cierre del tubo neural, en embriones del grupo testigo se alcanzan a ver las cinco vesículas cerebrales (Figura 7A), al igual que en los de ratas tratadas con ácido fólico (Figura 7C) y los de ratas bajo tratamiento con ácido fólico más nifedipino (Figura 7D), mientras que en algunos de los embriones de las ratas tratadas sólo con el antihipertensivo, no se alcanzaron a desarrollar todas las vesículas, y se observan estructuras huecas (Figura 7B).

Tanto los daños cardiacos como neurales son indicativos de alteración de procesos en la etapa de neurulación/organogénesis, como se observa en los embriones antes del corte (Figura 5); mientras que cuando se observan las estructuras normales en embriones tratados con ácido fólico (con o sin nifedipino), este hallazgo es indicativo de mejoría de dichos procesos.

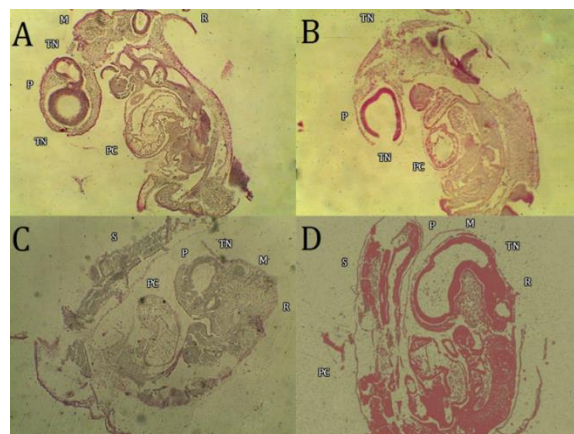


Figura 7. Cortes histológicos longitudinales de embriones de 11.5 días de edad gestacional de ratas tratadas con nifedipino (B), ácido fólico (C) y nifedipino más ácido fólico (D); se muestra un embrión control (A) para fines de comparación. (Elaboración propia). TN: tubo neural; P: prosencéfalo; M: mesencéfalo; R: rombencéfalo; S: somitas; PC: primordio cardiaco.

Se puede decir entonces que el tratamiento con ácido fólico se relaciona con un mejor desarrollo en comparación con los grupos a los que no se les administró el ácido fólico. Tal como indican Oyama et al. (2009) esta biomolécula es un cofactor importante para la síntesis de nucleótidos, por lo cual su insuficiencia durante el periodo inicial del desarrollo, blastulación, gastrulación y neurulación, provoca un retraso en el desarrollo embrionario, mientras que una adecuada concentración de ácido fólico tuvo un efecto preventivo sobre defectos en el desarrollo embrionario.

Es pertinente hacer notar que en general, los parámetros reproductivos evaluados en el presente reporte para el grupo tratado con ácido fólico (sin nifedipino) son mejores que en el grupo control intacto; lo que quiere decir que la condición hipertensa produce efectos deletéreos para la progenie y que el ácido fólico los revierte, sin afectar la presión arterial.

Conclusiones

- El tratamiento con nifedipino mostró un efecto teratogénico profundo, ya que causó severos retrasos en el desarrollo del tubo neural, primordio cardiaco y somitas.
- El ácido fólico demostró tener un efecto embrioprotector significativo sobre el retraso de desarrollo causado por el nifedipino.



- Adicionalmente, el ácido fólico puede revertir parcialmente la baja tasa reproductiva que la hipertensión produce en la cepa.
- Existe una correlación moderada entre la presión arterial diastólica y el número de fetos por camada; tal vez incluir más hembras en cada grupo pudiera ayudar a comprender mejor dicha correlación.
- Para estudios posteriores, se sugiere determinar la presión arterial antes de los tratamientos; es probable que se obtenga una mejor correlación si se analiza el cambio en la presión arterial debida al tratamiento (y no con la presión en sí) con el tamaño de camada.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala el acceso a las ratas de la cepa SHR, el uso del pletismógrafo, y las pláticas sobre el uso del aparato y los conocimientos básicos de hipertensión.

Se agradece al Biól. Tomás Ernesto Villamar Duque del bioterio de la Facultad el cuidado de los sujetos experimentales, además de su instrucción en el adecuado trato hacia con los animales de laboratorio.

A Jessica Guadalupe Gaona Uribe por adiestrar a los alumnos de metodología en el manejo de técnicas.

Montserrat Pérez Corona ayudó a los autores en la determinación de la presión arterial y la observación de los embriones.

Dulce Raquel Flores Olmedo ayudó al diseño de las figuras 5 y 7 a partir de las microfotografías.

Referencias

- Abela D., Ritchie H., Ababneh D., Gavin C., Nilsson M., Khan M., Carlsson K., Webster W. (2010). The effect of drugs with ion channel-blocking activity on the early embryonic rat heart. *Birth. Def. Res.* 89: 429-440.
- Ahokas R.A., Sibai, B.M. (1990). The relationship between experimentally determined litter size and maternal blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162: 841-847.
- Aluclu M., Tuncer M., Guzel A., Aluclu M., Akkus M. (2009). The effects of valproic acid on sciatic nerve of fetal rats and protective effects of folic acid and vitamin E. *Int. J. Morphol.*, 27: 285-294.

Brown N.A.; Fabro S. (1981). Quantitation of embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology*, 26: 65-78.

Cheng Z.-Y., Tian X., Gao, J., Li, H.-M., Jia, L.-J., Qiao H.-J. (2014). Contribution of baicalin on the plasma protein binding displacement and CYP3A activity inhibition to the pharmacokinetic changes of nifedipine in rats in vivo and in vitro. *Plos ONE*. 9: 371-379.

Daniel W.W. (2007): Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 1a. Ed. Limusa-Wiley, México, D.F. pp. 430-440.

Danielsson B.R.G., Reiland S., Rundqvist, E., Danielson M. (1989). Digital defects induced by vasodilating agents: relationship to reduction in uteroplacental blood flow. *Teratology*, 40: 351-358.

Erb C. (2006). Embryology and teratology. En: Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. y Frankin, C.L. (editores). The laboratory rat. 2a. Ed. Academic Press, Amsterdam, pp. 817-846.

FDA (U.S. Food and Drug Administration, Consultado 21 de Agosto de (2015). <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm275491.htm>).

Grollman A., Grollman, B. (1962). The teratogenic induction of hypertension. *J. Clin. Invest.* 41: 710-714.

Hernández, J. (2009). Diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial en el embarazo. 1a. Ed. Prado. México. p. 533.

Hibbard E., Smithells R. (1965). Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 285: 536-538.

Nilsson M., Sköld A., Ericson A., Annas A., Villar R., Cebers G., Hellmond H., Gustafson A., Webser W. (2012). Comparative effects of sodium channel blockers in short term rat whole embryo culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272: 306-312.

Oyama K., Sugimura Y., Murase T., Uchida A., Hayasaka S., Oiso Y., Murata Y. (2009). Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Endocr. J.*, 56: 29-37.

Peracoli J. C., Viera C. R. M., Saletto S. M., da Silva F. R. J. (2001). Effects of hypertension on maternal adaptations to pregnancy: experimental study on spontaneously hypertensive rats. *Sao Paulo Med. J.*, 119: 54-58.



Pagano M. (1991). Prescripción de fármacos en el Embarazo. 1a. Ed. Interamericana. México, D.F. pp. 19-45.

Rivera C.C., Hernández G.R., Marin S.H. (2013). Manejo reproductivo de las colonias de rata espontáneamente hipertensa (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Redvet 14, 11B (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n11113B.htm>; consultado el 12 de enero de 2015).

Voto L. (2008). Hipertensión en el Embarazo. 1a. Ed. Corpus. Argentina. pp. 45-47, 232.