

---

---

# Patrón de Apoptosis de células blancas de sangre de cordón umbilical (CBSCU) en cultivos *in vitro* producido por la Carbamacepina, Metotrexate y Acido Fólico

---

**ARIAS, A.** <sup>1</sup>  
**ASCARRUNZ, M.E.** <sup>2</sup>  
**TIRADO, N.** <sup>3</sup>  
**RADA, A.** <sup>4</sup>  
**CUTI, M.** <sup>5</sup>

- 1 *Docente investigador. Instituto de Genética - UMSA*
- 2 *Docente Emérito. Instituto de Genética - UMSA*
- 3 *Docente titular. Instituto de Genética - UMSA*
- 4 *Asistente de Investigación I. Instituto de Genética - UMSA*
- 5 *Técnico de Investigación III. Instituto de Genética - UMSA*

*Instituto de Genética, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia*

## RESUMEN

Se evaluó el patrón de apoptosis de células blancas de sangre de cordón umbilical producido por la carbamacepina y metotrexate de potencial teratogénico conocido y ácido fólico con efecto protector de defectos de tubo neural, en cultivos *in vitro*. Se empleó un diseño Completamente al Azar con 9 repeticiones, el cual responde a un modelo lineal aditivo.

Se estudió la acción protectora del ácido fólico en presencia de MTX y CBZ en cultivos *in vitro* de células blancas de cordón umbilical. Se demostró que el anticonvulsivante CBZ y el agente anti-inflamatorio MTX inducen apoptosis a 100uM y 50uM respectivamente (dosis terapéuticas).

En este estudio se encontró que la presencia de ACF (0,1-10uM) protege a las células blancas de cordón umbilical contra la inducción de la apoptosis producida por la CBZ y MTX. Por el contrario el ACF no suprime la muerte celular debida al tiempo de cultivo. Entonces el ACF tiene un efecto robusto de protección contra la apoptosis en células blancas de cordón umbilical, esta propiedad provee una nueva vía para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de esta vitamina.

Los datos reportados en este estudio son los primeros resultados generados sobre el efecto del MTX, CBZ y ACF y co-cultivos CBZ + ACF, MTX + ACF en cultivos de células blancas de sangre de cordón umbilical humano, demostrándose que esta metodología *in vitro* es capaz de detectar el efecto de agentes protectores y teratogénicos justificándose estudios posteriores de validación de la técnica y evaluación de otros medicamentos para su aplicación clínica.

## PALABRAS CLAVE

## ABSTRACT

Apoptosis pattern from *in vitro* cultures from umbilical cord white cells produced by carbamazepin and metotrexate of known teratogenic potencial and folic acid with protective effect of neural tube defects was evaluated. A completely randomized

desing was used, with 9 repetitions answering to a lineal additive model.

The protective action of folic acid in presence of MTX and CBZ *in vitro* cultures from umbilical cord white cells was studied. It demonstrates that CBZ an anticonvulsivant and MTX antiinflammatory drug induced apoptosis at 100  $\mu$ M and 50  $\mu$ M respectively (therapeutic dosis).

In this study was found that the presence of folic acid (0.1 to 10  $\mu$ M) exert a protective action of umbilical cord white cells against apoptosis induction produced by CBZ and MTX. otherwise, folic acid do not avoid the cellular death during the culture time. So, folic acid has a hard protective effect against apoptosis from umbilical cord white cells, this property provide a new way for the study of the cellular and molecular mechanism of this vitamin.

The facts reported in this study are the primary results generated about MTX, CBZ and folic acid effect, likewise, CBZ plus folic acid and MTX plus folic acid in human umbilical cord white cells, demonstrating that this *in vitro* methodology is capable to detect protective and teratogenic effects. This support subsequent studies of technique validity and other drugs evaluation for clinical applications.

## INTRODUCCIÓN

La sangre de cordón umbilical es rica en células madre y progenitoras con capacidad de proliferación *in vitro*. Estas células han sido usadas como una fuente de células madres y progenitoras, además de ser una fuente de células para repoblar la médula ósea para el tratamiento de enfermedades pediátricas.<sup>1,2,3,4,5</sup> En modelos murinos estas células administradas por vía intravenosa son capaces de diferenciarse y mejorar la recuperación funcional neurológica post- embolia, de manera tal que las células de sangre de cordón umbilical presentan una capacidad extensiva de diferenciación en varios linajes celulares semejjando a las células embrionarias durante el desarrollo fetal. La apoptosis es uno de los determinantes fisiológicos importantes del desarrollo embrionario, controlado a nivel molecular. En el presente estudio se pretende emplear a estas células como modelo para evaluar si el patrón de apoptosis es alterado por agentes de potencial teratogénico conocido como la carbamacepina y el metotrexate y la acción del ácido fólico en combinación con los anteriores agentes, debido al rol que juega como agente de efecto protector de malformaciones del Sistema Nervioso Central o defectos de cierre de tubo neural (DTN's).

La deficiencia de folato causa una incorporación masiva de uracilo en el DNA humano y ocasiona quiebras

cromosómicas así como una frecuencia elevada de micronúcleos, por lo tanto un aumento del riesgo a cáncer y defectos asociados con deficiencia de folato, que pueden ser revertidos por la administración de ácido fólico.

La epilepsia es la mayor complicación neurológica normalmente encontrada durante el embarazo. La prevalencia de esta enfermedad en la población general es aproximadamente del 0.6- 1% y aproximadamente 0.5% de todos los embarazos ocurren en mujeres con epilepsia. Las mujeres con epilepsia deben continuar su medicación durante el embarazo ya que al abandonarla pueden tener una frecuencia aumentada de ataques con el resultante potencial de morbi-mortalidad materna y fetal. Sin embargo las drogas antiepilépticas usualmente empleadas cruzan la placenta e individualmente han sido implicados en malformaciones congénitas, anomalías craneofaciales, defectos cardíacos y defectos de cierre de tubo neural<sup>7,8,9,10 y 11</sup>.

Uno de los medicamentos empleados para el tratamiento de la epilepsia durante el embarazo es la carbamacepina; sin embargo esta ha sido asociada con múltiples anomalías congénitas<sup>8,10,11,12, 13,14,15,16,17</sup>. El mecanismo de la teratogénesis de este medicamento es aún desconocido sin embargo diferentes estudios señalan su capacidad de inducir apoptosis en células gránulo cerebelares a concentraciones elevadas y fisiológicas<sup>18,19,20 y 21</sup>. No se han reportado estudios sobre los efectos de la carbamacepina en combinación con el ácido fólico de efecto neuroprotector conocido<sup>10,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35</sup>. Por tanto el presente estudio pretende determinar si el ácido fólico administrado en combinación con la carbamacepina a cultivos de células mononucleares tiene algún efecto sobre el patrón de apoptosis inducido por la carbamacepina sola. Los defectos genéticos del cigoto como las aberraciones cromosómicas son la causa más frecuente de desarrollo embrionario anormal y aborto espontáneo. Durante la embriogénesis existe un balance estricto entre la mitosis y la apoptosis de manera que las alteraciones en el patrón de apoptosis determinan la aparición de malformaciones congénitas. Así diferentes estudios<sup>36,37,38</sup> han determinado que los abortos espontáneos y alteraciones del crecimiento del embrión están vinculados con alteraciones en la apoptosis. Estas alteraciones están relacionadas con la aparición de algunos tipos de defectos de cierre de tubo neural, enfermedades neurodegenerativas, retardo mental, paladar hendido y otras malformaciones orofaciales congénitas, además de defectos cardíacos.<sup>39,40,41,42</sup> Se ha determinado que muchas drogas que producen daño celular y/o daño al DNA pueden alterar el patrón de apoptosis de los diferentes linajes celulares, produciendo enfermedades degenerativas, neoplasias y malformaciones congénitas<sup>43,44 40,45,46,47</sup> señalándose la importancia de la apoptosis durante la morfogénesis y desarrollo de malformaciones congénitas. Por tanto la

evaluación del efecto de los fármacos sobre el patrón de apoptosis de las células que circulan por el feto podría ser una nueva herramienta de evaluación de riesgo de los diferentes agentes para producir alteraciones en el desarrollo fetal.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se recolectaron muestras de 9 recién nacidos, 4 del Hospital de la Mujer y 5 del Hospital Materno Infantil. La sangre de cordón umbilical fue utilizada como fuente de células madre, progenitoras y de proliferación *in vitro*. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Genética Médica y la Unidad de Genética Toxicológica del Instituto de Genética, Facultad de Medicina, UMSA.

Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron colectadas después del nacimiento al momento del corte del cordón umbilical y fueron conservadas en tubos vacutainer estériles con EDTA. De estas muestras se obtuvo la fracción de leucocitos por centrifugación y los glóbulos rojos fueron eliminados por lisis en 0.1% de Bicarbonato de Sodio (pH7,0). Entonces se determinó el número de células blancas por el método del Azul Tripán, sembrándose entre 1 a  $5 \times 10^5$  cel/ml en los medios de cultivo de los siguientes tratamientos:

A los 1,2 y 6 días de cultivo se recuperaron por centrifugación las células blancas que fueron resuspendidas en D-MEM. A partir de la suspensión celular se realizaron los frotis para la evaluación de la morfología de apoptosis de acuerdo al protocolo descrito por Arias *et al.* 2001<sup>43</sup>.

Tratamiento 0:	T <sub>0</sub>	Control negativo.
Tratamiento 1:	T <sub>1</sub>	Metotrexate (MTX) 50 uM (Control positivo).
Tratamiento 2:	T <sub>2</sub>	Carbamacepina (CBZ)100 uM.
Tratamiento 3:	T <sub>3</sub>	Ácido Fólico (ACF)1 uM.
Tratamiento 4:	T <sub>4</sub>	50 uM Metotrexate (MTX) + 1 uM Ácido fólico.
Tratamiento 5:	T <sub>5</sub>	100 uM Carbamacepina (CBZ) + 0,1 uM Ácido fólico.
Tratamiento 6:	T <sub>6</sub>	100 uM Carbamacepina (CBZ) + 1 uM Ácido fólico.
Tratamiento 7:	T <sub>7</sub>	100 uM Carbamacepina (CBZ) + 10 uM Ácido fólico.

Para la evaluación del DNA en escalera el remanente de la suspensión celular fue sujeto de una extracción ligera de DNA en base a SDS 10% y TNE 1X, luego de incubar la suspensión a 60 °C se realizó una electroforesis en PAGE al 3,5% 200 V/1h revelándose los productos por tinción con Nitrato de Plata. El patrón de apoptosis del DNA en escalera se evaluó por comparación con los controles negativos.

Para el análisis del patrón de apoptosis por morfología se reportó el número de células apoptóticas en 300 células totales. Los resultados fueron expresados en promedio y desviación standard de experimentos independientes. El porcentaje de protección a la apoptosis fue calculado como la razón del porcentaje de apoptosis en la presencia y ausencia del fármaco en los cultivos. El análisis estadístico de los datos fue realizado con la prueba t de Student.

### **RESULTADO**

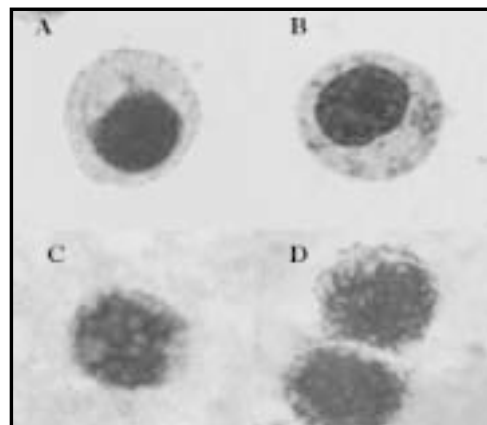
#### **Patrón de apoptosis normal de células blancas de sangre de cordón umbilical en cultivos *in vitro* (CBSCU)**

Las células apoptóticas fueron reconocidas por la ausencia de núcleo y una distribución homogénea de cromatina en toda la masa celular, lo que sugiere que la condensación y desintegración nuclear característica de la apoptosis ha ocurrido. Se definió como células normales a todas aquellas que conservaron su núcleo intacto (Figura 1).

La cinética de la apoptosis demostró un incremento progresivo desde el primer día hasta el cuarto día de cultivo (Figura 2).

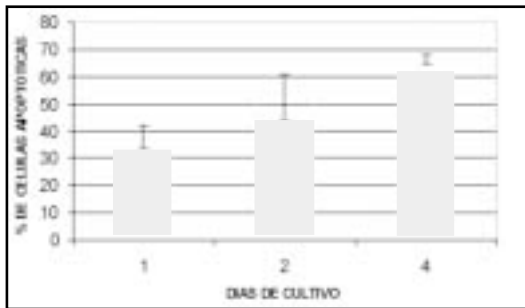
La fragmentación del DNA característica de la apoptosis fue demostrada por electroforesis en PAGE; partiéndose de un barrido de DNA ligeramente detectable con una banda clara de DNA de alto peso molecular después de un día de cultivo hasta la aparición de un barrido de DNA notorio con desaparición del DNA de alto peso molecular para los 4 días de cultivo. Se considera un porcentaje bajo de apoptosis cuando se conserva el DNA

**FIGURA 1**



Morfología de las células blancas de sangre de cordón umbilical en cultivos *in vitro*. A y B morfología de células normales, C y D morfología de células apoptóticas

**FIGURA 2**  
**PATRON DE APOPTOSIS NORMAL DE LEUCOCITOS DE CORDON UMBILICAL**



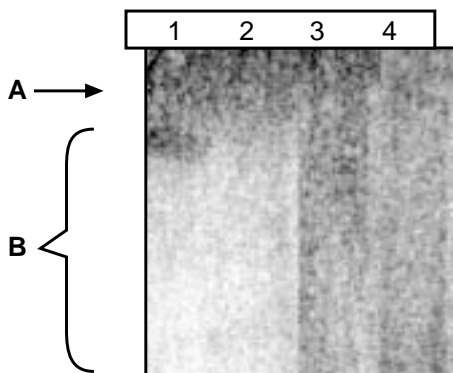
*Cinética de la apoptosis de células blancas de sangre de cordón umbilical en cultivos in vitro*

de alto peso molecular y no se observa un barrido intenso de DNA, se considera un porcentaje alto de apoptosis cuando el barrido de DNA es intenso y el DNA de alto peso molecular desaparece (Figura 3).

**Efecto del MTX y CBZ sobre el patrón de apoptosis**

La incubación de las CBSCU en medio con MTX 50uM, resultó en un incremento del porcentaje de apoptosis. En el presente ensayo el porcentaje máximo de apoptosis detectado fue alcanzado a los 4 días de cultivo. Un efecto similar se observó para los cultivos con 100uM de CBZ, en los que el porcentaje máximo de apoptosis también se alcanza a los 4 días de cultivo (Fig 4). La exposición de las CBSCU a CBZ o MTX por 1,2 y 4 días resultó en una marcada fragmentación del DNA revelada como un barrido de DNA en el gel de PAGE. La CBZ y el MTX indujeron un incremento de la apoptosis en relación al cultivo control con PBS observándose una banda nítida de DNA de alto peso molecular en el control, vs. los barridos de DNA generados por la CBZ y el MTX. El ACF no tiene efecto significativo en la electroforesis sobre el patrón de apoptosis observándose un patrón similar al del control (Figuras 4 y 5).

**FIGURA 3**



*Electroforesis en PAGE 3,5%, 200V/1h de DNA extraído. Carriles: 1= 0 horas de cultivo; 2= un día de cultivo; 3= dos días de cultivo; 4= cuatro días de cultivo. Resultados representativos de al menos 5 experimentos independientes. A= DNA de alto peso molecular; B= DNA degradado*

**Efecto del ácido fólico (ACF) sobre el patrón de apoptosis**

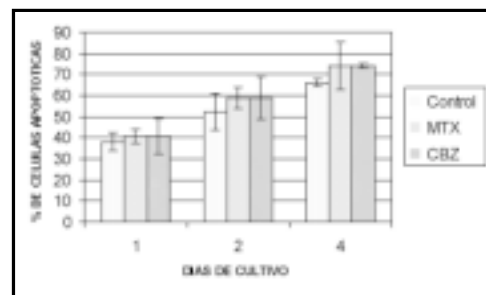
La presencia de ACF en los medios no determinó un cambio específico en el porcentaje de apoptosis en relación al cultivo control, no habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el cultivo con ACF. El análisis del patrón de degradación de DNA por electroforesis de los cultivos determinó la ausencia de efectos inductores de la apoptosis, observándose el mismo patrón de apoptosis en presencia y ausencia de ácido fólico. De manera que el ACF por si mismo es incapaz de alterar el patrón de apoptosis de las células blancas de sangre de cordón umbilical humana (Figura 6).

**Efecto del ACF sobre el patrón de apoptosis inducido por MTX y CBZ**

Dado que el MTX es un derivado poliglutamato puede interferir en la actividad de varias enzimas dependientes de folatos, se probó si la inducción de la apoptosis en células blancas de cordón umbilical por MTX podría ser inhibida por el ácido fólico. De acuerdo a los datos presentados el ACF es capaz de inhibir la actividad del MTX, presentándose un porcentaje de protección del 70,6% a una concentración de 1µM a los 4 días de cultivo. El ACF protege contra la inducción de la apoptosis en células blancas de sangre de cordón umbilical por CBZ. La exposición de estas células a la CBZ en el medio por 4 días resulta en un incremento del número de células apoptóticas. El co-tratamiento con ACF reduce marcadamente la actividad de la CBZ, mientras que la exposición a solamente ACF no afecta significativamente al patrón de apoptosis. Obteniéndose un porcentaje de protección del 83,4% a los 4 días de cultivo. La pérdida de la viabilidad celular inducida por la CBZ y MTX incremento progresivamente de acuerdo al tiempo de tratamiento de 1 a 4 días. La presencia de 1uM de ACF protegió marcadamente contra la toxicidad inducida por cualquiera de los 2 medicamentos en todos los tiempos analizados (Figuras 7 y 8).

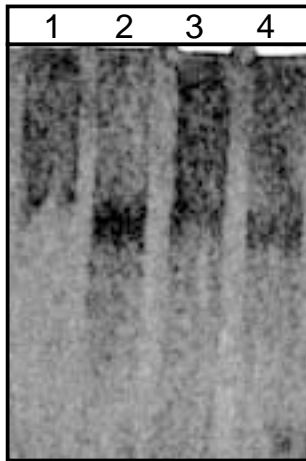
**FIGURA 4**

**PATRON DE APOPTOSIS DE CELULAS BLANCAS DE CORDON UMBILICAL INDUCIDO POR EL METOTREXATE Y LA CARBAMACEPINA**



*Patrón de apoptosis de CBSCU inducido por el MTX y la CBZ en comparación con el patrón normal. En amarillo patrón de apoptosis normal, en rosa patrón de apoptosis inducido por el MTX, en azul patrón de apoptosis inducido por la CBZ*

**FIGURA 5**



Patrón de apoptosis inducido por el MTX, CBZ y ACF a los 2 días de cultivo. La fragmentación del DNA fue evaluada por electroforesis en PAGE 3,5% 200v/1h. 1= DNA extraído del cultivo control; 2= DNA extraído del cultivo con MTX; 3= DNA extraído del cultivo con CBZ; 4= DNA extraído del cultivo con ACF. Resultados representativo de 4 experimentos independientes.

La exposición de las CBSCU a CBZ o MTX por 1,2 y 4 días resulta en una marcada fragmentación del DNA revelada como un barrido de DNA en el gel de PAGE. La presencia de ACF evita la aparición de este barrido de DNA. (Figura 9).

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

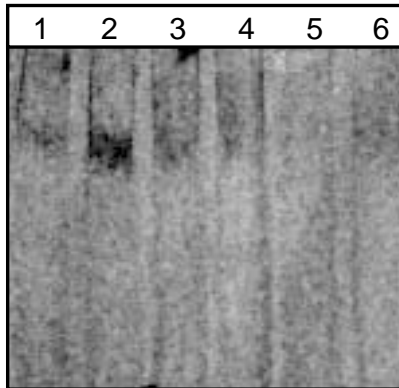
La sangre de cordón umbilical humano por la facilidad de su obtención y la presencia de células madres y progenitoras representa un recurso importante para la innovación de terapias y ensayos *in vitro*. El uso de este tipo de muestras como sistema modelo para la evaluación del efecto de agentes tóxicos no ha sido reportado anteriormente. Sin embargo presenta las ventaja de evaluar al mismo tiempo el efecto de un fármaco sobre células diferenciadas e indiferenciadas, genera datos previos a un ensayo clínico, es un sistema más rápido que los sistemas que emplean a todo el organismo, se puede determinar dosis máximas y mínimas y analizar el efectos de varios fármacos por separado y en co-cultivo sin sufrir el efecto de la

variabilidad debida al empleo de varios especimenes experimentales, al ser un sistema bien definido posibilita un mayor control de las variables, es flexible y tolera tratamientos que podrían matar a los animales en experimentos *in vivo*, presentan resultados reproducibles y están libres de consideraciones éticas relacionadas con los experimentos en animales. De acuerdo a una búsqueda extensiva en MedLine este es el primer trabajo que evalúa el efecto de agentes teratógenicos conocidos (CBZ y MTX) y neuroprotectores (ACF) en cultivos *in vitro* de células blancas de sangre de cordón umbilical.

El MTX es un antagonista de folatos extensivamente usado para la prevención de rechazo tisular, la artritis reumatoide y otros desórdenes inflamatorios crónicos. Además de su actividad anti-inflamatoria el MTX presenta propiedades antiproliferativas por la inhibición de la dihidrofolato reductasa y otras enzimas dependientes de folatos. De acuerdo a lo reportado anteriormente el MTX induce apoptosis en linfocitos presentando una mayor tendencia a inducir apoptosis en las células mitogenicamente activadas; lo cual determina que durante el embarazo podría afectar a las células de rápida división celular embrionarias. El efecto reportado del ACF en el presente estudio determinaría que este podría ser usado como tratamiento y prevención para la exposición accidental con MTX en mujeres embarazadas. Lo cual señala la necesidad de mayores estudios en sistemas experimentales sobre la capacidad inhibidora de la teratogénesis del ACF en combinación con la actividad teratogénica del MTX y otros medicamentos como la CBZ.

Anteriores estudios han reportado el efecto protector del ACF sobre el MTX en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica, lo que coincide con los datos encontrados en el presente trabajo. Sin embargo el efecto protector del ACF sobre la CBZ en cultivos celulares no ha sido reportado, a pesar que el ACF es coadministrado con la CBZ en mujeres embarazadas

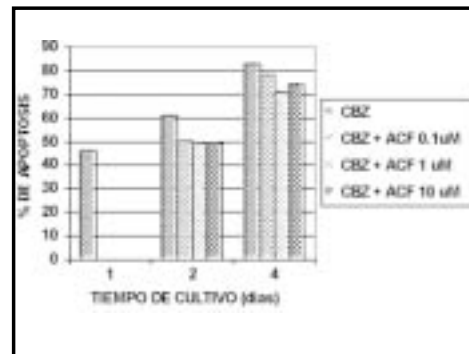
**FIGURA 6**



Patrón de apoptosis en presencia de ACF.- Carriles 1 y 2= un día de cultivo, 1= DNA del cultivo control; 2= DNA del cultivo con ACF; 3 y 4 dos días de cultivo, 3= DNA del cultivo control; 4= DNA del cultivo con ACF; 5 y 6 cuatro días de cultivo, 5= DNA del cultivo control; 6= DNA del cultivo con ACF. Resultados representativos de 8 experimentos independientes.

**FIGURA 7**

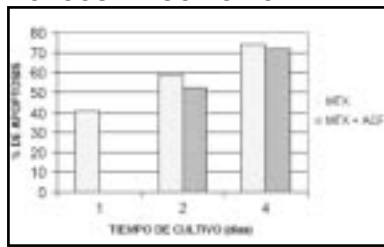
**EFFECTO DEL ACF EN EL PATRON DE APOPTOSIS INDUCIDO POR LA CBZ**



A) Células expuestas a 100uM de CBZ en presencia de 0,1uM de ACF, B) 1uM y C) 10uM. La sobrevivencia celular fue determinada por morfología después de 1 y 3 días después de la adición del ACF. Los datos representan la media + SD de 4 cultivos independientes.

FIGURA 8

EFFECTO DEL ACF EN EL PATRON DE APOPTOSIS DE CBZCU INDUCIDO POR EL MTX



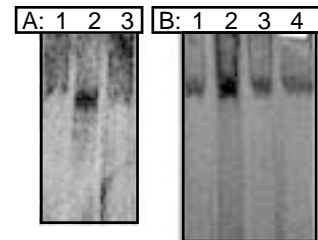
Las células blancas de sangre de cordón umbilical fueron incubadas por 24 horas en medio D-MEM con 50uM de MTX, para posteriormente ser tratadas con ACF 1uM, se reporta los resultados después de 1, 2 y 4 días de cultivo. Los valores presentados son la media + DS de al menos 4 experimentos independientes

con epilepsia. Los resultados de este estudio serían (ha nuestro conocimiento) los primeros estudios de cultivo *in vitro* que apoyan esta práctica, señalándose un posible efecto protector de ACF contra la CBZ. A pesar que la protección ante la apoptosis inducida por el anticonvulsivante CBZ ocurre en dosis inferiores a la terapéutica (0,1uM y 1uM) efectos más robustos fueron encontrados en la dosis terapéutica 10uM. Debido a que la protección no requiere de un pre-tratamiento y requiere dosis relativamente bajas de ACF, es probable que presente efectividad clínica. La protección por el ACF contra la apoptosis inducida por la CBZ podría ser clínicamente relevante dado que las mujeres embarazadas con epilepsia bajo tratamiento con CBZ no pueden abandonar su tratamiento. Las dosis supraterapéuticas de CBZ pueden ser teratogénicas e inducir ataxia, nistagmus y vértigo sugiriendo un mal funcionamiento cerebelar. Si la apoptosis inducida por altas dosis de CBZ ocurre *in vivo* y puede ser suprimida por el ACF, este último podría ser un tratamiento a mujeres embarazadas pre y post-exposición a CBZ.

Se ha estudiado la acción protectora del ácido fólico en contra del MTX y CBZ en cultivos de células blancas de cordón umbilical. Al mismo tiempo se ha demostrado que el anticonvulsivante CBZ y el agente anti-inflamatorio MTX inducen apoptosis en las células blancas de sangre de cordón umbilical a 100uM y 50uM respectivamente (dosis terapéuticas). En este estudio se encontró que la co-presencia de ACF (0,1-10uM) protege a las células blancas de cordón umbilical contra la inducción de la apoptosis producida por la CBZ y MTX, como fue evaluado por la inspección morfológica y análisis del fraccionamiento del DNA. Por el contrario el ACF no suprime la muerte celular debida al tiempo de cultivo. Entonces el ACF tiene un efecto robusto de protección contra la apoptosis en células blancas de cordón umbilical, esta actividad provee una nueva vía para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de esta vitamina.

Los datos reportados en este proyecto son los primeros resultados generados sobre el efecto del MTX , CBZ y

FIGURA 9



El ácido fólico inhibe la fragmentación de DNA inducida por el MTX y la CBZ en las células blancas de sangre de cordón umbilical. **A:** Carriles: 1= DNA control; 2=ensayo con MTX; 3=co-cultivo MTX + ACF. **B:** 1= DNA control; 2= co-cultivo CBZ + ACF (0,1 uM); 3= co-cultivo CBZ + ACF (1 uM); 4= co-cultivo CBZ + ACF (10 uM). Los datos pertenecen a un experimento representativo de 7 experimentos independientes con resultados similares. Nótese la desaparición del barrido de DNA al incrementar la dosis del ACF.

ACF y co-cultivos CBZ + ACF, MTX + ACF en cultivos de células blancas de sangre de cordón umbilical humano, demostrándose que esta metodología *in vitro* es capaz de detectar el efecto de agentes protectores y teratogénicos justificándose estudios posteriores de validación de la técnica, evaluación de otros medicamentos para su aplicación clínica.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Instituto de Genética de la Facultad de Medicina de la UMSA. Se agradece a la Dra. Pilar Navia por su aporte en el diseño estadístico del trabajo. Así mismo, se agradece al Hospital materno infantil y al Hospital de la Mujer por las muestras de sangre de cordón umbilical gentilmente donadas para la ejecución del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Broxmeyer HE: Primitive Hematopoietic stem and progenitor cells in human Umbilical cord Blood: an alternative source of transplantable cells. *Cancer Treat Res.* 1996;84:139-148.
2. Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL, Zehnbauser B, Schmeckpeper B, Shah N, Griffin C, Emanuel PD, Zuckerman KS, Cooper S, et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Bloo.* 1992; 79:1874-1881.
3. Kohli-Kumar M, Shahidi NT, Broxmeyer HE, Masterson M, Delaat C, Sambrano J, Morris C, Auerbach AD, Harris RE. Haematopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. *Br. J. Haematol.* 1993;85:419-422.
4. Chen R, Ende N. The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *J. Med.* 2000;31:21-30.
5. Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M. Human umbilical cord blood effect on SOD mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci.* 2000;67:53-59.
6. Chen J, Sanberg P, Li Y, Wang L, Lu M, Willing A, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous Administration of Human

- Umbilical Cord Blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001;32:2682-2688.
7. Rochester, M.D., and Jeffrey T. Kirchner, D.O. .Epilepsy in Pregnancy. *American Family Physician*. 1997;56:
  8. Samren EB, van Duijn CM, Christiaens GC, Hofman A, Lindhout D. Antiepileptic drug regimens and major congenital abnormalities in the offspring. *Ann Neurol* 1999 Nov;46(5):739-46.
  9. Kaneko S, Battino D, Andermann E, Wada K, Kan R, Takeda A, Nakane Y, Ogawa Y, Avanzini G, Fumarola C, Granata T, Molteni F, Pardi G, Minotti L, Canger R, Dansky L, Oguni M, Lopes-Cendas I, Sherwin A, Andermann F, Seni MH, Okada M, Teranishi T. Congenital malformations due to antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 1999 Feb;33(2-3):145-58.
  10. Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000 Nov 30;343(22):1608-14.
  11. Diav-Citrin O, Shechtman S, Arnon J, Ornoy A. Is carbamazepine teratogenic? A prospective controlled study of 210 pregnancies. *Neurology* 2001 Jul 24;57(2):321-4.
  12. Matalon S, Schechtman S, Goldzweig G, Ornoy A. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reprod Toxicol* 2002 Jan-Feb;16(1):9-17.
  13. Jones KL, Lacro RV, Johnson KA, Adams J. Pattern of malformations in the children of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med* 1989;320:1661-6.
  14. Lindhout D, Meinardi H, Meijer JW, Nau H. Antiepileptic drugs and teratogenesis in two consecutive cohorts: changes in prescription policy paralleled by changes in pattern of malformations. *Neurology* 1992 Apr;42(4 Suppl 5):94-110.
  15. Little BB, Santos-Ramos R, Newell JF, Maberry MC. Megadose carbamazepine during the period of neural tube closure. *Obstet Gynecol* 1993 Oct;82(4 Pt 2 Suppl):705-8.
  16. Samren EB, van Duijn CM, Koch S, Hiilesmaa VK, Klepel H, Bardy AH, Mannagetta GB, Deichl AW, Gaily E, Granstrom ML, Meinardi H, Grobbee DE, Hofman A, Janz D, Lindhout D. Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy. *Epilepsia* 1997 Sep;38(9):981-90.
  17. Kaneko S, Otani K, Fukushima Y, Ogawa Y, Nomura Y, Ono T, Nakane Y, Teranishi T, Goto M. Teratogenicity of antiepileptic drugs: analysis of possible risk factors. *Epilepsia* 1988 Jul-Aug;29(4):459-67. Rosa FW. Spina bifida in infants of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med* 1991;324:674-7.
  18. Gao XM, Margolis RL, Leeds P, Hough C, Post RM, Chuang DM. Carbamazepine induction of apoptosis in cultured cerebellar neurons: effects of N-methyl-D-aspartate, aurointricarboxylic acid and cycloheximide. *Brain Res* 1995 Dec 12;703(1-2):63-71
  19. Saunders PA, Ishitani R, Leeds P and Chuang D-M. Comparison of carbamazepine, phenytoin, and age-induced cell death in cerebellar granule cells. *Soc Neurosci Abstr*. 1995; 21: 1553.
  20. Yan G-M, Irwin RP, Lin S-Z, Weller M, Wood KA and Paul SM. Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 983-990.
  21. Nonaka S, Katsube N, Chuang DM. Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Jul;286(1):539-47.
  22. Mulinare J., Cordero JF., Erickson J.D., Berry R.J. Periconceptional use of vitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA*.1988; 260:3141-3145.
  23. Bower C., Stanley F.J. Dietary folate as a risk factor for neural tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med. J. Aust.* 1989; 150:613-619.
  24. Mills J.L., Rhoads G.G., Simpson J.L. et al. The absence of relation between the periconceptional use of vitamins and neuronal tube defects. *N.Eng J.Med.* 1989; 321:430-435.
  25. Milunsky A., Jick H., Jik SS. Et al. Multivitamin folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA*. 1989; 261:2847-2852. Arroyo. S. Fármacos antiepilépticos. Indicaciones. Dosificación. Niveles plasmáticos. Interacciones medicamentosas. Enfermedad renal y hepática. Gestación y contracepción. En Manual de Terapia en Epilepsias de adultos y ancianos. Editado por G. Cruz-Campo. Pp 27-39 Sociedad Española de Neurología, 1998.
  26. CDC. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR*; 1992: 41 (no.RR-14): 1-7.
  27. CDC. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR*; 1991: 40: 513-516.
  28. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risk of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995; 346: 393-396.
  29. Locksmith GJ, Duff P. Preventing neural tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. *Obstetr & Gynecol*. 1998; 91 (6):1027-1034.
  30. MRCVSRG. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991; 338:131-137.
  31. Shaw GM, Velie EM, Schaffer D. Risk of neural tube defect - affected pregnancies among obese women. *JAMA* 1996; 275 (14): 1093-1096.
  32. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Ericson JD. Periconceptional multivitamin use and the occurrence conotruncal heart defects: results from a population based case-control study. *Pediatrics*. 1996; 98:911-917.
  33. Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology*. 1995;6:205-207.
  34. Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol*. 1996; 143: 1229-1234.
  35. Yang C, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J. Does periconceptional multivitamine use reduce the risk fro limb

- deficiency in offspring?. *Epidemiology* 1997; 8:157-161.
36. Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, Bradford W. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi.
  37. Vadillo Ortega F, Avila Vergara MA, Hernandez Guerrero C, Arechavaleta Velasco F, Beltran Montoya J. Apoptosis in trophoblast of patients with recurrent spontaneous abortion of unidentified cause. *Ginecol Obstet Mex* 2000 Mar;68:122-31. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88(3-4):230-5.
  38. Tamiolakis D, Papadopoulos N, Manavis J, Alexiadis G, Karamanidis D, Kotini A, Bounovas A, Simopoulos K. Differential expression of Bcl-2 proto-oncogene in the trophoblast from embryos with Down's syndrome and those after spontaneous abortion. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2001;28(3):163-7.
  39. Dorsey SG, Bambrick LL, Balice-Gordon RJ, Krueger BK. Failure of brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival in mouse trisomy 16. *J Neurosci* 2002 Apr 1;22(7):2571-8.
  40. Suwa F, Jin Y, Lu H, Li X, Tipoe GL, Lau TY, Tamada Y, Kuroki K, Fang YR. Alteration of apoptosis in cleft palate formation and ectomesenchymal stem cells influenced by retinoic acid. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2001 Dec;78(5):179-86.
  41. Pani L, Horal M, Loeken MR. Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002 Mar 15;16(6):676-80.
  42. Kubalak SW, Hutson DR, Scott KK, Shannon RA. Elevated transforming growth factor beta2 enhances apoptosis and contributes to abnormal outflow tract and aortic sac development in retinoic X receptor alpha knockout embryos. *Development* 2002 Feb;129(3):733-46.
  43. Moley KH. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endocrinol Metab* 2001 Mar;12(2):78-82.
  44. Edwards MJ, Walsh DA, Li Z. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. *Int J Dev Biol* 1997 Apr;41(2):345-58.
  45. Zakeri ZF, Ahuja HS. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mutat Res* 1997 Dec 12;396(1-2):149-61.
  46. Glozak MA, Rogers MB. Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP2 or BMP4. *Dev Biol* 1996 Nov 1;179(2):458-70.
  47. Halperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50(2):84-7.
  48. Steel G, Torrie J. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. 1990. México.
  49. Arias A, Amaru R, Navia P, Rodrigo G, Peñalosa R, Torrez G, Cuevas H y Vasquez A. Alteraciones del patrón de apoptosis de células precursoras de eritrocitos en mujeres postmenopáusicas con Eritrocitosis Patológica de la Altura. *Cuadernos* 2001 Mar. 46 (2): 31-40.
  50. Genestier L, Paillet R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of Methotrexate: Apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J.Clin. Invest.* 1998;102:322-328.
  51. Shigeyuki N, Katsube N & Chuang DM. Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, Phenytoin and Carbamazepine. *JPET* 1998;286:539-547.