



LA FENITOÍNA SÓDICA INDUCE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMÁTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN CD-1

PHENYTOIN SODIUM INDUCED MICRONUCLEI IN THE POLYCHROMATIC ERYTHROCYTES OF CD-1 MOUSE PERIPHERAL BLOOD

Norberto Alarcón-Herrera y Saúl Flores-Maya✉

Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090. Laboratorio de Recursos Naturales UBIPRO.

✉ saulsel@unam.mx ; nor_hammettesp@hotmail.com

•

ABSTRACT

Seizures are one of the most common neural disorders, and may be sporadic or recurrent (epilepsy) crisis. In the case of people with epilepsy, these must be treated throughout their lives, being a major phenytoin prescription for seizure control medicines out. However, despite having several decades in the market there is very little information about their genotoxic effects. Therefore in this study to evaluate the ability of phenytoin to induce genotoxic damage for 30 days using the micronucleus test in mice *Mus musculus* CD-1 strain. It was determined that the three doses of phenytoin used (2.8, 4.2 and 6.64 mg/kg) induced clastogenicity in mouse chromosomes, that at higher doses the damage is greater. Furthermore, also inhibiting cytotoxic damage induced cell kinetics for doses of 4.2 and 6.64 mg/kg.

Key words: anticonvulsant, epilepsy, clastogenesis, 5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione, monosodium salt.

RESUMEN

Las convulsiones son uno de los desórdenes neuronales más comunes, pudiendo ser crisis esporádicas o recurrentes (epilepsia). Para el caso de las personas epilépticas, estas deben de estar bajo tratamiento durante toda su vida, siendo la fenitoína uno de los principales medicamentos recetados para el control de las crisis. Sin embargo, a pesar de llevar varias décadas en el mercado existe poca información sobre sus efectos genotóxicos. Por ello en este trabajo se tuvo el objetivo de evaluar la capacidad de la fenitoína para inducir daño genotóxico durante 30 días utilizando el ensayo de micronúcleos en ratones *Mus musculus* cepa CD-1. Se determinó que las tres dosis de fenitoína usadas (2.8, 4.2 y 6.64 mg/kg) inducen clastogénesis en los cromosomas de ratón, determinando que a mayor dosis mayor es el daño. También se indujo daño citotóxico inhibiendo la cinética celular para las dosis de 4.2 y 6.64 mg/kg.

Palabras clave: anticonvulsivo, clastogénesis, epilepsia, 5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione, sal monosódica.

INTRODUCCIÓN

Las convulsiones o ataques epilépticos son una de las crisis neurológicas más comunes que pueden presentarse desde la infancia hasta la vejez. En estudios epidemiológicos alrededor del 1% de la población mundial padece de epilepsia y entre 1 y 3% tendrán estos ataques durante su vida. En México se consideran de 10 a 20 personas con epilepsia por cada 1000 individuos (López et al., 2009). Las causas de estas crisis pueden ser variadas desde eventos aislados y agudos (no asociados con la epilepsia) o bien crónicos recurrentes (asociados a epilepsia). El término epilepsia suele utilizarse cuando la persona presenta un desorden cerebral crónico caracterizado por convulsiones recurrentes (AEPSEUP, 2010).

Por tanto, las personas que sufren crisis recurrentes, deben estar bajo tratamiento médico. Medicamentos como el fenobarbital, carbamazepina y oxcarbazepina son usados para el control de ataques convulsivos. Sin embargo, la fenitoína sódica es uno de los medicamentos más usados por ser de los más accesibles para todo el público. Su farmacodinamia consiste en prolongar el período inactivo de los canales de sodio. Aunque a pesar de conocer sobre sus posibles efectos secundarios neurotóxicos, se desconocen sus posibles efectos genotóxicos y no existen estudios sobre daños a nivel teratogénico (Fernández et al., 2007). La dosis sugerida es de 4 mg/kg (300 mg en solución inyectable al día) aunque es recomendable que se haga un seguimiento de la dosis ya que mientras en algunas personas es eficiente una dosis de 2.6 mg/kg, en otros pacientes deben suministrarse hasta 5.3 mg/kg.

Por otro lado, es requisito obligatorio que por cada medicamento, vacuna, etc., que se desarrolle, se realice la evaluación genotóxica (Hayashi et al., 2000). Actualmente organizaciones internacionales como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) y la Organización para la Cooperación y Desarrollo económico (ODCE por sus siglas en inglés) han establecido la batería de pruebas que deben realizarse para evaluar la genotoxicidad de algunos alimentos, drogas, etc. Dicha batería de pruebas consta de: A) pruebas de dosis agudas a corto plazo como el ensayo de mutaciones inversas en bacterias, ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos, ensayo *in vitro* de mutación de genes en linfoma de ratón por timidina quinasa y el ensayo de inducción de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos, B) dosis subcrónicas y C) pruebas de dosis crónicas. Sin embargo, el desarrollo y especificaciones de cada prueba deben ser consideradas para cada tipo de sustancia que se vaya a probar así como el modelo biológico a utilizar (FDA, 2007).

El ensayo de micronúcleos (MCN) sobre eritrocitos de sangre periférica en ratones ha sido ampliamente utilizado para detectar agentes clastogénicos (rompimiento de cromosomas) y aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico alterando el número cromosómico) *in vivo* (Flores et al., 2013). Los ensayos de micronúcleos, tienen gran importancia debido a que son estudios que se pueden llevar de la mano con un estudio general toxicológico, a la obtención de resultados de una forma relativamente rápida y además por su alta sensibilidad a clastógenos y aneuploidógenos que llegan a los tejidos diana (Hamada et al., 2001).

Las pruebas de MCN consisten en detectar el efecto de los agentes clastogénicos y aneuploidogénicos en los cromosomas, esto por medio de la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosómicos que se rezagan en la mitosis, los cuales quedan fuera del núcleo formando dichos micronúcleos (Velasco, 2011).

En un principio, los ensayos de micronúcleos fueron desarrollados en eritrocitos de médula ósea de ratón pero, posteriormente con algunas modificaciones se pudo aplicar a diversas especies y tejidos como hígado, células germinales y tejidos fetales o neonatales. El identificar MCN en eritrocitos de sangre periférica, en cualquier especie, depende principalmente del grado de eficacia del sistema retículo endotelial (en especial el bazo) que cumple con la función de eliminar los eritrocitos viejos y/o anómalos. Por tanto, si la especie tiene una mayor eficiencia de eliminación, puede reducir la posibilidad de observar eritrocitos micronucleados independientemente de si el organismo está siendo afectado por un agente genotóxico (MacGregor et al., 1990).

A pesar de que la fenitoína sódica tiene varias décadas en el mercado farmacéutico, hasta el momento solo Leal et al. (1990), han establecido un cierto efecto genotóxico utilizando intercambio de cromátidas hermanas y recientemente Yüksel et al. (2010), observaron su potencial genotóxico utilizando la prueba de SMART. Estos dos trabajos demostraron un cierto potencial genotóxico en estos modelos biológicos y aunado al largo período de exposición de las personas epilépticas a este fármaco, surge la interrogante ¿La fenitoína es citogenotóxica en ratones CD1? Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto citotóxico y genotóxico de la fenitoína sódica, anticipando que, sí la fenitoína provoca clastogénesis y aneuploidías en ratones cepa CD-1, entonces se observarán efectos a nivel cromosómico en la inducción de micronúcleos en células de sangre periférica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se usaron machos de ratones de la cepa CD-1 de ocho semanas de edad con un peso aproximado entre 25 y 30 g. Los organismos fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Desde la aclimatación hasta el final del experimento los organismos se mantuvieron en condiciones de laboratorio a 21 ± 2 °C con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h, con acceso a alimento especial para ratones y agua *ad libitum*.

Diseño experimental

Se formaron cinco lotes (marcando a los animales previamente) cada uno con cinco organismos y distribuidos de la siguiente manera: 1) un testigo negativo al cual sólo se le administró agua y el alimento especial para roedores, 2) un testigo positivo en el cual se aplicó en solo una ocasión 0.3 ml de ciclohexamida por vía intraperitoneal con una dosis de 60 mg/kg (Hettinger et al., 2007), 3) un lote experimental al cual se le administró vía intraperitoneal la fenitoína sódica con una dosis de 2.8 mg/kg, 4) a este lote experimental se le aplicó de la misma forma la fenitoína sódica con dosis de 4.2 mg/kg y al lote 5 se aplicó la fenitoína sódica en una

dosis de 6.64 mg/kg. A cada ratón de los lotes experimentales se les administraron 0.3 ml de la fenitoína sódica cada 24 h durante 30 días.

Posterior a la administración de la fenitoína sódica, se procedió a extraer sangre realizando una punción en la zona caudal de los ratones a las 24, 48, 72 y 192 h de haber sido administrada la fenitoína sódica y a los 15 y 30 días. La gota de sangre se colocó sobre una laminilla y se procedió a realizar un frotis (tres laminillas por ratón). Inmediatamente se fijaron las muestras con metanol. Las laminillas fueron sometidas a un tren de tinción de hematoxilina/eosina por 10 minutos (MA et al., 1995).

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones fueron contabilizadas auxiliándose de un microscopio óptico Nikon y posteriormente se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. Se observaron un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MCNCP) por ratón y por día (MA et al., 1995).

Con el fin de monitorear visualmente a los ratones buscando alguna reacción secundaria o alérgica al aplicar intraperitonealmente las diferentes dosis de la fenitoína, se realizó el conteo de 200 células blancas (linfocitos, segmentados, eosinófilos, basófilos y monocitos) por ratón para cada día de muestreo.

Análisis estadístico

Los índices de genotoxicidad (%) y toxicidad (%) se calcularon mediante el método propuesto por Hayashi et al., (2000). Para ambos índices se consideró un total de 2000 eritrocitos.

Las fórmulas para calcular ambos índices son las siguientes:

% Toxicidad: $[\text{No de CP}/2000] \times 100$

% Genotoxicidad: $\% \text{MCN} = \text{No. de MCNCP} / 2000 \text{ células totales} \times 100$.

Los datos fueron organizados en tablas y los resultados se promediaron para realizar un ANOVA de un factor y una prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Para poder dar un resultado global de la toxicidad y genotoxicidad se realizó un análisis estadístico contemplando todos los días de muestreo (24, 48, 72, 192 h, 15 días y 30 días) (Tabla 1). De esta manera los valores promedio del efecto toxicológico evaluados de forma global mostraron un valor de $F: F_{obs} = 12.85 > F_{4,25}^{\alpha 0.05} = 2.76$. Es decir, los valores promedios de los tratamientos presentan alguna diferencia significativa en relación a la proporción de células policromáticas y normocromáticas. Sin embargo, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que solo las dosis de 4.2 y 6.64 mg/kg presentan diferencias significativas con respecto al testigo negativo (Fig. 1).

En los ratones del lote testigo positivo así como en el tratamiento de fenitoína de 6.64 mg/kg, se observó una irritación en la piel desde la espalda media hasta la nuca que inició a partir de las 192 h de exposición y se mantuvo hasta los 15 días, posterior a este tiempo los ratones se recuperaron desapareciendo dicha irritación.

Por otro lado, al calcular el porcentaje de genotoxicidad se observaron los siguientes valores $F_{(obs)} = 20.04 > F_{4,25}^{\alpha 0.05} = 2.76$, confirmando estadísticamente un efecto genotóxico en los ratones provocado por las diferentes concentraciones empleadas de fenitoína sódica (Tabla 1 y Fig. 2). Dicho efecto se corroboró con la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

Tabla 1. Valores de toxicidad para cada tratamiento, evaluando la proporción de eritrocitos policromáticos y normocromáticos (%T) y la frecuencia de micronúcleos en EPC de sangre periférica de ratón CD-1 (*M. musculus*). Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y **múltiple de Dunnett comparando los tratamientos con el testigo negativo.

Tratamientos	Toxicidad promedio	Desv est	Genotoxicidad promedio	Desv est
Testigo negativo	16.636	0.589	0.140	0.064
Testigo positivo	9.341**	0.729	0.809**	0.167
Fenitoína 2.8 mg/kg	14.021	2.412	0.391**	0.099
Fenitoína 4.2 mg/kg	13.526**	2.253	0.566**	0.093
Fenitoína 6.64 mg/kg	12.863**	2.074	0.776**	0.065

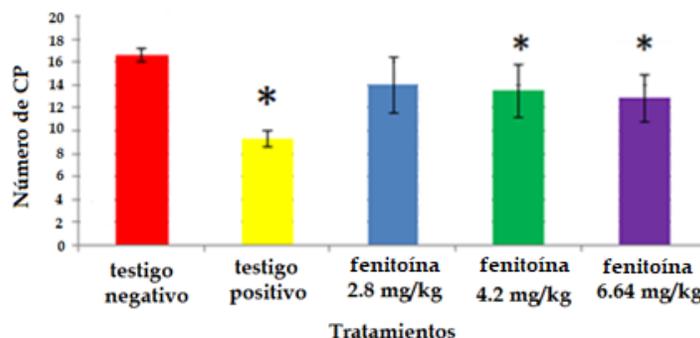


Fig. 1. Se observan los valores de toxicidad (expresado en porcentaje) de forma global para cada tratamiento. Se aprecia un decremento en el control positivo (cicloheximida) y a su vez un ligero decremento en las tres dosis de fenitoína. Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y *múltiple de Dunnett comparando los tratamientos con el testigo negativo.

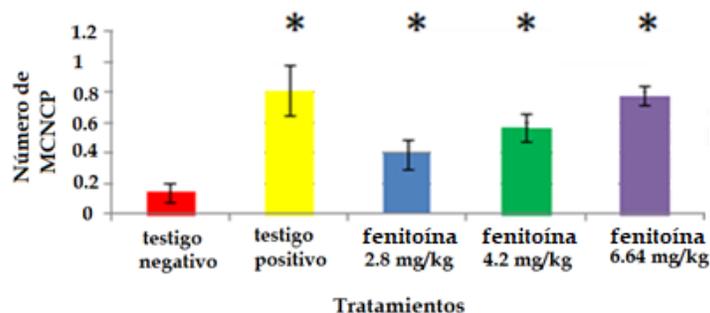


Fig. 2. Se observan los valores de genotoxicidad (expresado en porcentaje) de manera global para cada tratamiento. Observando el mayor incremento en el testigo positivo (cicloheximida), y un aumento significativo para cada dosis de fenitoína, presentando una relación a dosis altas mayor daño. Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y *múltiple de Dunnett comparando los tratamientos con el testigo negativo.

Por otro lado, los valores hematológicos que presentaron los ratones se encontraron dentro del rango común, pues a diferencia de los humanos donde las células predominantes son los eosinófilos segmentados, para ratones y roedores en general los linfocitos comprenden del 55 al 75% de células predominantes seguidos por los eosinófilos segmentados (como lo señala Basurto et al., 2000). Por ello, el que los ratones no hayan entrado en un shock anafiláctico se debió a la elevación de eosinófilos segmentados conforme a la dosis de fenitoína, los cuales cumplen con una función estabilizadora (Fig. 3).

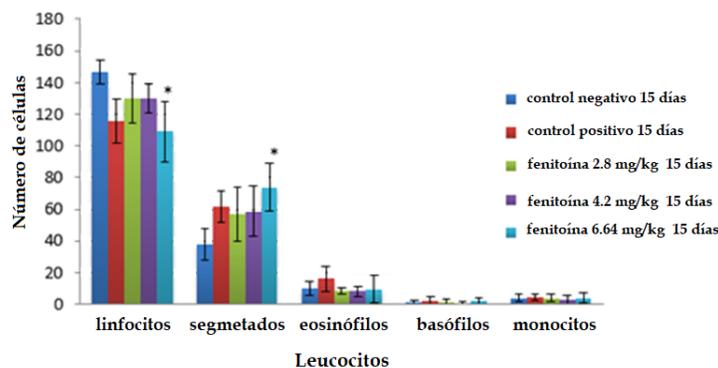


Fig. 3. Proporción de células blancas presentes durante el tiempo de 15 días para cada uno de los tratamientos, contemplando el conteo de 200 células.

DISCUSIÓN

Con fines de monitorear el buen desarrollo del proceso experimental, en el presente estudio se consideró a la cicloheximida como un testigo positivo debido a su potencial citogenotóxico, García (2008) la cataloga como un inhibidor de la síntesis proteica y por ende genera una disminución en la proliferación celular (Fig.1). Además la cicloheximida interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional e inhibiendo la función del factor de elongación eEF2 que media la translocación de la peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P, y por ende la elongación de la traducción.

En el análisis estadístico sobre los valores de la proporción de células policromáticas y normocromáticas las dosis de fenitoína sódica de 4.2 y 6.64 mg/kg mostraron un ligero efecto inhibitorio en la cinética de las células policromáticas y normocromáticas. De acuerdo con lo señalado por Hernández et al. (2005), este decremento en la cinética celular podría estar relacionado con la disminución de folatos a causa de la fenitoína, ya que se da una inhibición intestinal de la absorción de los folatos causada por este medicamento y por la interacción con el metabolismo hepático de los anticonvulsivantes debido a la inducción de enzimas hepáticas microsomales que originan una disminución de las concentraciones séricas de los folatos.

La concentración de 6.64 mg/kg, y la cicloheximida provocaron una irritación en los ratones desde la espalda media hasta la nuca a partir de las 192 h y perduró hasta los 15 días aproximadamente; esto concuerda con lo reportado por Soto et al. (2011), quienes mencionan que los niveles séricos de la fenitoína suelen influir en la presencia de rash, que es un efecto secundario común de la fenitoína, caracterizado por la presencia de erupciones cutáneas. Es probable que esta toxicidad se deba a la formación de un metabolito tóxico que posiblemente sea un reactivo

intermediario y el precursor epóxido de la fenitoína. Sin embargo, es posible que estas erupciones cutáneas no solo se deban a los efectos secundarios del metabolismo xenobiótico sino que también pueden intervenir procesos inmunológicos.

En este estudio también se observó lo señalado por Estrella et al. (2007), quienes mencionan que la irritación se relaciona con la pérdida en la proporción de linfocitos y de eosinófilos segmentados generando el Síndrome de Hipersensibilidad a anticonvulsivantes (Fig. 3). Esto debido a que los componentes aromáticos, con núcleo hexamérico y la disposición espacial de cargas de la fenitoína provocan una reactividad cruzada e interacciones con sistemas enzimáticos. Además, la presencia de queratinocitos con CYP 450 activo permiten el metabolismo de anticomicales (aromáticos principalmente). Si esta cadena enzimática (CYP450) presenta alguna deficiencia, provoca una respuesta inmunológica desencadenando el tropismo cutáneo observado.

Respecto a la genotoxicidad, las tres dosis usadas de fenitoína sódica demostraron sus propiedades clastogénicas y aneuploidogénicas. El comportamiento genotóxico siguió un patrón de dosis-respuesta, es decir al ser mayor la dosis mayor es el efecto genotóxico (Fig. 2). Por otro lado, Hayashi et al., (2000) y Flores et al. (2013), señalan que el efecto del clastógeno actúa principalmente a las 72 h y no presenta efecto acumulativo en estudios agudos. En el presente caso, al ser un estudio semicrónico, se demuestra que el efecto genotóxico ocurre en las primeras 72 h, el efecto se incrementó a mayor tiempo de exposición a la fenitoína (Fig. 2). Por otra parte, Sardas (1994), señala mediante estudios de intercambio de cromátidas hermanas, que la fenitoína sí es un compuesto genotóxico pero que la duración de la terapia y las dosis no intervienen en dicho efecto. Sin embargo, éste estudio demuestra que las dosis y el tiempo sí juegan un papel importante en el desarrollo del efecto genotóxico.

Del mismo modo, Flores et al. (2013), indican que el incremento de micronúcleos en las primeras 24 h y su posterior disminución hasta las 72 h, se debe a dos posibles factores: 1) a los mecanismos naturales de reparación celular y 2) a la posible acción del sistema retículo endotelial (SER), en particular el bazo y la médula ósea del organismo, que fue capaz de neutralizar a los agentes químicos ya que las células de estos órganos tienen la capacidad de fagocitar a todos aquellos elementos agresivos o dañinos para el organismo. Esto puede explicar la disminución del índice de inducción de micronúcleos a las 48 h.

Por otro lado, Leal et al. (1990), determinaron el efecto genotóxico de la fenitoína mediante el uso de intercambio de cromátidas hermanas y Yüksel et al. (2010), determinaron el potencial genotóxico utilizando la prueba de SMART y a pesar de que Kindig et al. (2003), afirman que la fenitoína no es clastogénica en pruebas a corto plazo, la gran discrepancia que existe entre diversos estudios publicados, permite poner en duda dicha afirmación y establecer que los estudios crónicos y semicrónicos pueden arrojar información relevante en los estudios de genotoxicidad y toxicidad.

Finalmente, aclarando que la concentración de fenitoína y la exposición crónica juegan un papel importante en la respuesta del efecto genotóxico, se concluye que: 1) la fenitoína sódica produce efectos clastogénicos y aneuploidogénicos en eritrocitos policromáticos de ratón cepa CD-1, 2) el grado del efecto genotóxico de la fenitoína es directamente proporcional a la concentración y 3) la fenitoína inhibe la cinética de los eritrocitos policromáticos de ratón cepa CD-1.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa ayuda de la Dra. Martha Martínez García y del Dr. Elías Piedra Ibarra por la revisión y sugerencias al manuscrito.

REFERENCIAS

1. AEPSEUP (Asociación Española de Pediatría, Sociedad Española de Urgencias Pediátricas), 2010. Protocolos diagnóstico-terapéutico de urgencias pediátricas SEUP-AEP-Ergón, S.A.
2. Basurto F., R. Mondragón, D. Atilano, J. Montaraz, M. Marqués, P. Rosas y R. Marroquín, 2000. Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico et/+ y desnudo et/et. *Veterinaria México*, 31(3): 209-216.
3. Estrella V., E. Baroni, M.B. Leroux, A. Sánchez, A. Bergero y R. Fernández-Bussy, 2007. Síndrome de hipersensibilidad a anticonvulsivantes (SHA). *Revista Argentina de Dermatología*, 88: 46-54.
4. FDA (Food and Drug Administration), 2007. Redbook. U.S. Department of Health and Human Services.
5. Fernández G., V. Gómez y C. Vallena, 2007. Tratamiento de la epilepsia durante el embarazo. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, 169: 19-23.
6. Flores S.M., H.B. Escorcía, A.F. Cornejo, D.E.C. Vázquez, A.C.H. Cruz, V.M.H. Valdéz y L.I.N. Peña, 2013. Efectos citogenéticos de la fórmula comercial de una tableta antigripal en los eritrocitos de sangre periférica de ratón árabe (*Mus musculus* Linnaeus, 1758). *BIOCYT Biología, Ciencia y Tecnología*, 6: 388-397.
7. García P.B.E., 2008. Efecto de diversos inhibidores endocíticos sobre la entrada de micobacterias a fibroblastos de pulmón murinos (MLg). Informe final proyecto SIP-20080400. Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Departamento de Inmunología, México.
8. Hamada S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, S. Ozawa, K. Kondo, M. Nakajima, H. Shimada, K. Osawa, Y. Kondo, N. Asano, S. Sato, H. Tamura, N. Yajima, R. Marshall, C. Moore, D.H. Blakey, L.M. Schechtman, J.L. Weaver, D.K. Torous, R. Proudlock, S. Ito, Ch. Namiki, y M. Hayashi, 2001. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37: 93-110.
9. Hayashi M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I.D. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo y S. Sutou, 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 234-252.
10. Hernández R., M. Fernández, G. Miranda y R. Suástegui, 2005. Disminución del ácido fólico y alteraciones cognitivas en pacientes con epilepsia tratados con fenitoína o carbamazepina, estudio piloto. *Revista de Investigación Clínica*, 57(4): 522-531.
11. Hettlinger T.P., B.K. Formaker, y M.E. Frank, 2007. Cycloheximide: No ordinary bitter stimulus. *Behavioural Brain Research*, 180(1): 4-17.

12. Kindig D., ML. Garriot, J.W. Parton y J.E. Beyers, 1992. Diphenylhydantoin is not genotoxic in a battery of short-term cytogenetic assays. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 12(1): 43-50.
13. Leal C.G., C.G. Valenciano, C.R. Flores y G.R. Chapa, 1990. Efecto del difenilhidantoinato de sodio (DFH) sobre la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) en ratones. *Archivos de Investigación Médica*, 21: 211-215.
14. López-Meraz M., L.L. Rocha, M. Miquel, M.E. Hernández, R.T. Cárdenas, G.A. Coria-Ávila, L.I. García, C.A. Pérez-Estudillo, G.E. Aranda-Abreu y J. Manzo, 2009. Conceptos básicos de epilepsia. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 9(2): 32-37.
15. Ma T.H., X. Zhou, G.F. Loarca, G.G. Arreola y S.U. Lecona, 1995. Mouse-erythrocyte micronucleus (Mus-EMN) assay on the clastogenicity of industrial wastewater. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 11(2): 95-98.
16. MacGregor J.T., C.M. Wehr, P.R. Henika y M.D. Shelby, 1990. The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14: 513-522.
17. Sardas S., M. Ada, A.E. Karakaya y N. Aydin, 1994. Sister-chromatid exchanges in epileptic patients on anticonvulsant therapy. *Mutation Research*, 313: 21-24.
18. Soto A., M. Lavados y F. Araya, 2011. Rash y anemia aplásica inducidos por fenitoína: caso clínico. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 49: 171-176.
19. Velasco P.L., 2011. Determinación del posible efecto clastogénico de *Psittacanthus calyculatus* en sangre periférica de ratón CD-1. (Tesis Profesional, FESI, Universidad Nacional Autónoma de México, México).
20. Yüksel M., R. Sarıkaya y N. Bostanci, 2010. Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2682-2687.

BIOCYT Biología, Ciencia y Tecnología, se encuentra actualmente indexada en



alojada en los repositorios



y en bases electrónicas de bibliotecas

