

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**ABERRACIONES CROMOSOMICAS E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS
HERMANAS EN INDIVIDUOS CON FARMACOTERAPIA
A BASE DE DIFENILHIDANTOINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA MARTHA COLIN MANILLA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

| | | |
|----|---|---|
| I | INTRODUCCION | 1 |
| II | ANTECEDENTES | 2 |
| | 1.1 Definición de la epilepsia. | |
| | 1.2 Historia natural de la epilepsia. | |
| | 2.1 Clasificación. | |
| | 3.1 Epidemiología. | |
| | 4.1 Etiología. | |
| | a. Herencia. | |
| | b. Edad. | |
| | c. Alcoholismo. | |
| | d. Factores medioambientales. | |
| | e. Parasitosis. | |
| | 5.1 Electrofisiología. | |
| | 6.1 Tratamiento de la epilepsia | |
| | a. Historia. | |
| | 7.1 Difenilhidantoína. Generalidades. | |
| | 7.2 Farmacocinética. | |
| | a. Absorción. | |
| | b. Distribución. | |
| | c. Metabolismo. | |
| | d. Eliminación. | |
| | 7.3 Niveles sérico y control de la dosis. | |
| | 7.4 Toxicidad clínica. | |
| | 7.5 Teratogénesis. | |
| | 7.6 Mutagénesis. | |
| | a. Evidencias citogenéticas. | |
| | b. Intercambio de Cromátidas Hermanas. Técnicas auto radiográficas y no autoradiográficas. Mecanismos- de formación . Estudios de Intercambio de Cromáti tidas Hermanas en poblaciones expuestas. Induc--- ción de Intercambios de Cromatidas Hermanas por - medicamentos "in vivo". | |

| | | |
|-----|-------------------------|----|
| III | MATERIAL Y METODO | 23 |
| IV | RESULTADOS | 26 |
| V | DISCUSION | 37 |
| VI | BIBLIOGRAFIA..... | 42 |

Manuscrito de la Universidad de la Habana

I INTRODUCCION.

La difenilhidantoina es un medicamento utilizado ampliamente en el tratamiento de la epilepsia. El posible riesgo por su administración se hizo notar con la descripción del síndrome de la difenilhidantoina en productos de mujeres epilépticas tratadas con la droga durante el embarazo. (7), (12), (26), (37), (59).

Estudios posteriores realizados con respecto a su actividad mutagénica han dado resultados contradictorios, así mientras que Herha y Obe en 1976 (23) reportan un incremento en la frecuencia cromosomas dicéntricos en pacientes tratados con la droga, Barch en 1975 (4) no encuentra incremento en el porcentaje de aberración de sus pacientes. Recientemente Habedank y col. en 1982 (20), reportan un incremento significativo en el promedio de intercambios de cromátidas hermanas en niños epilépticos tratados con difenilhidantoina (DFH). "In vitro" Lerner y Dixon 1973 (36), reportan un incremento de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (I.C.H.) con concentraciones altas de DFH, sin que finalmente se pueda elaborar un criterio concluyente de su verdadero efecto a este nivel.

En México al igual que en el resto del mundo, la DFH es un medicamento de amplio consumo.

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (I.N.N.N) por ser un centro de concentración de problemas neurológicos, se tratan un 80% de pacientes con epilepsia, de estos aproximadamente un 18% es tratado con DFH.

Con la finalidad de poder contribuir con la serie de investigaciones que se han avocado a determinar la capacidad mutagénica de este medicamento, se diseñó este trabajo de tesis, utilizando como sistema de prueba los efectos a nivel citogenético en cultivo de linfocitos procedentes de pacientes epilépticos con tratamiento crónico a base de difenilhidantoina.

II ANTECEDENTES.

1.1 Definición de la epilepsia.

La palabra epilepsia se deriva de una preposición griega y un verbo irregular, que quiere decir: "ser sobrecogido bruscamente", "ser atrapado" ó "algo que cae bruscamente sobre el individuo". (12).

Clínicamente las epilepsias se definen como: "Afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes - debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epiléticas), asociadas eventualmente a diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas". (54).

1.2 Historia de las epilepsias.

El conocimiento de las epilepsias es muy antiguo y su descripción ha sufrido notables variaciones dependiendo del grado de cultura y costumbres de la época.

Para los romanos era una enfermedad sagrada, y si ocurría - una crisis epilética durante las reuniones o actos electorales, - éstas se suspendían.

Hipócrates (460-377 A.C.) escribió el primer tratado de las epilepsias y lo tituló "La enfermedad sagrada", él reporta que el centro de la enfermedad es el cerebro y describe las variaciones generalizadas y focales. A pesar del trabajo de Hipócrates prevalecieron los criterios erróneos, como la naturaleza divina o demoníaca de esta enfermedad.

Galeno (129-199 D.C.) la describe como una enfermedad que se caracteriza por la pérdida intempestiva del conocimiento acompañada de convulsiones.

En México Martín de la Cruz, médico azteca del siglo XVI, - hace algunas referencias en el Códice Badiano (1556), en especial al tratamiento de las epilepsias.

Pero no es sino hasta el siglo XIX en el año de 1802 en que Heberd describe algunas características clínicas que se presentan de manera diferente en niños y en adultos.

En 1815 Jean Etienne Dominique Esquirol, propone los términos "gran mal" y "petit mal", términos que en la actualidad tienden a no utilizarse.

Huglings Jackson en 1861 describe la llamada "epilepsia Jacksoniana" la cual definió como: El conjunto de descargas locales súbitas y excesivas en la materia gris, introduciéndose la hipótesis que un foco epileptógeno era el causante de las crisis convulsivas.

Jean Martin Charcot y col. en 1862 describen variaciones clínicas especialmente en el diagnóstico diferencial de la histeria y la epilepsia. (12).

La electroencefalografía introducida por Hans Berger en 1929 permitió observar el primer registro gráfico del potencial eléctrico de la corteza cerebral, obteniéndose posteriormente el registro electrofisiológico de la descarga epiléptica. (24)

Numerosos trabajos han establecido que la actividad eléctrica del cerebro, se registra en forma de ondas, las cuales según su forma y frecuencia se describen como ritmos alfa, beta, theta y delta. En el individuo normal y en reposo las descargas eléctricas de las células nerviosas se producen a intervalos regulares y no en forma continua. En las crisis epilépticas ocurre todo lo contrario, la descarga eléctrica es simultánea en un determinado número de células cerebrales, lo cual se refleja en el electroencefalograma por la aparición de ondas cerebrales anormales amplias, breves y puntiagudas. (24)

William Lennox en 1932 (Rubio D.) contribuyó en forma importante a difundir mundialmente los conocimientos sobre esta enfermedad, fundando la Liga Internacional de lucha contra la epilepsia la cual cuenta en México con una filial aceptada, denominada Campaña Mexicana de lucha contra la epilepsia cuyas siglas son CAMELICE

Pero no es sino hasta el siglo XIX en el año de 1802 en que Heberd describe algunas características clínicas que se presentan de manera diferente en niños y en adultos.

En 1815 Jean Etienne Dominique Esquirol, propone los términos "gran mal" y "petit mal", términos que en la actualidad tienden a no utilizarse.

Huglings Jackson en 1861 describe la llamada "epilepsia Jacksoniana" la cual definió como: El conjunto de descargas locales súbitas y excesivas en la materia gris, introduciéndose la hipótesis que un foco epileptógeno era el causante de las crisis convulsivas.

Jean Martin Charcot y col. en 1862 describen variaciones clínicas especialmente en el diagnóstico diferencial de la histeria y la epilepsia. (12).

La electroencefalografía introducida por Hans Berger en 1929 permitió observar el primer registro gráfico del potencial eléctrico de la corteza cerebral, obteniéndose posteriormente el registro electrofisiológico de la descarga epiléptica. (24)

Numerosos trabajos han establecido que la actividad eléctrica del cerebro, se registra en forma de ondas, las cuales según su forma y frecuencia se describen como ritmos alfa, beta, theta y delta. En el individuo normal y en reposo las descargas eléctricas de las células nerviosas se producen a intervalos regulares y no en forma continua. En las crisis epilépticas ocurre todo lo contrario, la descarga eléctrica es simultánea en un determinado número de células cerebrales, lo cual se refleja en el electroencefalograma por la aparición de ondas cerebrales anormales amplias, breves y puntiagudas. (24)

William Lennox en 1932 (Rubio D.) contribuyó en forma importante a difundir mundialmente los conocimientos sobre esta enfermedad, fundando la Liga Internacional de lucha contra la epilepsia la cual cuenta en México con una filial aceptada, denominada Campaña Mexicana de lucha contra la epilepsia cuyas siglas son CAMELICE

fundada en 1969.

2.1 Clasificación.

Debido a su complejidad clínica las epilepsias se han clasificado en varios grupos, los cuales son aceptados internacionalmente:

a.- Crisis parciales. Comprenden dos aspectos principales, - las que se acompañan de sintomatología elemental y las que presentan sintomatología compleja, destacando entre estas últimas las -- llamadas crisis del lóbulo temporal con sintomatología psicomotora y automatismo.

b.- Crisis generalizadas. Con manifestaciones bilaterales - simétricas y sin inicio local incluyendo aquí las ausencias típicas antes conocidas con el término poco apropiado de "pequeño mal".

c.- Crisis unilaterales. Son más frecuentes y notorias en la infancia y se agrupan aisladamente, porque no presentan una lesión focal, presentandose en la mayor parte de los casos en niños - en los que la maduración cerebral no es completa.

d.- Crisis epilépticas no clasificables por insuficiencia - de datos. (53)

3.1 Epidemiología.

Prevalencia e incidencia. La prevalencia mundial para la epilepsia se calcula que es de 3 a 6 epilépticos por cada 1000 habitantes, esta cifra solo incluye a los pacientes que se encuentran bajo tratamiento médico.

La incidencia mundial según el tipo de crisis es de 40% para pacientes con crisis generalizadas y 60% para pacientes con crisis parciales.

En México no disponemos de datos relativos a la frecuencia de esta enfermedad, pero se calcula que hay alrededor de 90,000 epilépticos en el país, con 3,000 nuevos casos cada año. (15)

4.1 Etiología.

Existen varios factores que influyen en la etiología de las epilepsias los cuales se resumen de la siguiente manera:

a.- Herencia.- Desde hace varios años diferentes autores -- han señalado la importancia de los factores hereditarios en la etiología de las epilepsias.

Las evidencias del papel que juega la genética en las epilepsias son de dos tipos: directas e indirectas, las primeras son proporcionadas por los estudios de agregación familiar que muestran que la frecuencia de parientes con epilepsia de probandos epilépticos, es mayor que la encontrada en grupos controles y que lo esperado para la población general.

Actualmente los estudios de agregación familiar se tratan de hacer en grupos homogéneos de pacientes en cuanto a tipo de crisis, edad de inicio, hallazgos electroencefalográficos, etc. y gracias a esto se ha observado que existen algunos tipos de epilepsia en los que la predisposición hereditaria es mayor, como en el síndrome centrencefálico descrito por Metrakos y Metrakos (42). En este síndrome los autores reportan herencia autosómica dominante, -- con penetrancia dependiente de la edad. En el caso de la epilepsia benigna de la niñez, llamada epilepsia Rolándrica, se ha postulado herencia autosómica dominante con penetrancia dependiente de la edad (42).

En el caso de las crisis parciales se piensa que la predisposición hereditaria es menor y se ha postulado herencia multifactorial.

Las evidencias indirectas provienen de los estudios en animales de experimentación, principalmente roedores, en los cuales se ha observado que existen cepas con susceptibilidad hereditaria para determinado tipo de crisis, por ejemplo existen cepas de ratas con susceptibilidad hereditaria para las crisis audiogénicas. - (22). Otra evidencia indirecta proviene de la gran cantidad de enfermedades con herencia mendeliana, en las cuales las convulsiones

forman parte del cuadro clínico, como la neurofibromatosis, la esclerosis tuberosa y la fenilcetonuria, así como algunos síndromes cromosómicos en los cuales se presentan convulsiones con mayor frecuencia de la esperada, como en el síndrome de Klinefelter y el -- síndrome de Down. (3)

En general se puede decir que las epilepsias son un grupo heterogéneo en los cuales la predisposición hereditaria es variable dependiendo del tipo de epilepsia.

b.- Edad.- Tiene una importancia fundamental, ya que existe un predominio en la frecuencia de ataques o crisis epilépticas en niños y adolescentes. Es muy probable que el cerebro del niño y del adolescente por encontrarse en pleno desarrollo sea más susceptible a sufrir crisis.

La epilepsia generalizada motora que se acompañan de una anormalidad electroencefalográfica de tipo subcortical suelen aparecer alrededor de los tres años aumentando su frecuencia de aparición a partir de esta edad y hasta alcanzar su máximo entre los ocho y quince años, resultando poco frecuente de ahí en adelante. - (13)

c.- Alcoholismo.- Se considera el alcoholismo como un factor desencadenante de crisis epilépticas, ya que se ha observado que la supresión alcohólica se relaciona estrechamente con éstas, siempre y cuando el individuo tenga predisposición e tener dicha enfermedad. (53)

d.- Factores medioambientales.- Estos pueden ser determinantes, y tan es así que la situación socioeconómica de un país determina la frecuencia de epilépticos al año.

En un ambiente urbano con poco desarrollo económico e escasas facilidades médicas los partos son más problemáticos y los niños nacen en un ambiente más hostil. Esto representa un factor ambiental socioeconómico que interviene directamente en la frecuencia con que estos niños desarrollarán posteriormente epilepsia por

afecciones perinatales. (53)

e.- Parasitosis.- En un país como el nuestro con escasos recursos económicos y escasas medidas de higiene en la población, la cisticercosis sigue siendo uno de los factores etiológicos más importantes para la aparición de crisis convulsivas tanto en niños como en adultos. (53)

5.1 Electrofisiología de la descarga epiléptica.

Desde el punto de vista clínico la epilepsia se caracteriza por episodios breves, recurrentes de convulsiones o de otras alteraciones motoras o de la conducta de tipo estereotipado que se asocian con una percepción alterada con una anomalía o pérdida de la conciencia. Los signos clínicos de una crisis epiléptica dependerán de la región del cerebro cuyas funciones se ven alteradas - por la actividad epiléptica, de acuerdo a esto, la conciencia se pierde cuando la descarga epiléptica invade las estructuras del tallo cerebral alto y del tálamo. Las contracciones de la musculatura esquelética aparecen cuando la descarga afecta las áreas motoras frontales de la corteza cerebral. Una vez que un conjunto de neuronas han sido precipitadas a un estado anormal de hiperexcitabilidad existen tres consecuencias posibles:

a.- La descarga permanece localizada, de tal forma que el grupo de neuronas finalmente cese en su actividad anormal.

b.- La descarga puede propagarse a una distancia variable a través de las estructuras anormales del sistema nervioso, sin afectar a todo el encéfalo, encontrando cierta resistencia a su propagación y por lo tanto terminando la crisis al llegar a este punto.

c.- La descarga puede extenderse a través de todo el neuroeje antes de terminar. En los primeros dos casos se llama crisis --parcial en el tercer caso se llama generalizada. En las crisis generalizadas la conciencia siempre está afectada y ambos hemisferios cerebrales así como sus conexiones con los núcleos subcorticales (talamo, ganglios basales, tallo cerebral y estructuras límbi--

cas) siempre se encuentran afectadas simultaneamente por la actividad epiléptica.

En las crisis parciales la conciencia habitualmente se conserva cuando la descarga epiléptica aparece confinada a un hemisferio cerebral, pero puede perderse cuando las estructuras límbicas o el diencefalo se ven afectados por dicha descarga.

Existe una serie de mecanismos básicos que determinan el potencial de membrana de la neurona. La membrana neuronal tiene permeabilidad en relación a los iones que se encuentran en el espacio inter e intracelular, el potasio está más concentrado en el espacio intercelular. Esta diferencia es dinámica y hay un constante intercambio iónico, el sodio entrando a la célula y el potasio saliendo de ella. Este movimiento es una difusión pasiva.

Se ha demostrado que existe un proceso activo que utiliza energía metabólica derivada de compuestos ricos en fósforo como el ATP (adenosín trifosfato), para modificar el potencial de membrana este proceso está relacionando con la bomba de sodio y potasio. -- Existe una evidencia clara de que la bomba de sodio y potasio de cada ión es electrogénica, sobre todo durante actividad neuronal intensa, de tal forma que causa un incremento asimétrico de iones, con dos potasios introduciendose por cada tres sodios que esten extrayendose de la célula nerviosa. Este bombeo asimétrico hiperpolariza la membrana y este proceso puede terminar con la descarga epiléptica.

La membrana postsináptica llega a ser permeable selectivamente a uno o varios iones específicos. La liberación de sustancias transmisoras por la terminal presináptica evoca o produce el cambio de la permeabilidad, pero la especialización de la unión postsináptica determina si la permeabilidad inducida tendrá una influencia excitatoria o inhibitoria.

Las crisis epilépticas resultan de una depolarización rápida y repetitiva de las neuronas, la depolarización se acompaña de una acumulación de iones de sodio dentro de la célula y por una --

y por una disminución del potasio intracelular. Durante la repolarización, al momento en que la célula vuelve a su potencial de reposo normal, los iones de sodio son extraídos y los de potasio son introducidos al citoplasma neuronal. Este es un proceso que consume energía y que es precedido por un aumento en la actividad del -ATP.

Durante las crisis epilépticas las neuronas afectadas son - más fácilmente depolarizadas y menos aptas para volver a su potencial de membrana normal, entre cada descarga.

Las neuronas que están afectadas o incluidas en una descarga epiléptica utilizan energía considerablemente mayor que la que utilizarían si el cerebro estuviera funcionando normalmente. Además de aumentar el transporte iónico estos procesos metabólicos celulares están afectados durante la actividad epiléptica. Esto incluye la síntesis de neurotransmisores, el intercambio de lípidos y el - transporte axoplásmico.

Estos procesos directa o indirectamente requieren el uso de energía generada químicamente. Durante las crisis epilépticas hay un aumento en la producción de ésta, la fuente directa más importante de energía en el cerebro es el ATP, sin embargo a diferencia de otros tejidos, el cerebro depende más específicamente del metabolismo de la glucosa para la producción de compuestos fosfatados de alta energía. (11)

6.1 Tratamiento de las epilepsias.

a.- Historia. El manejo del paciente epiléptico está basado en la identificación clínica del paciente y del tipo de crisis - lo que puede estar complementado por el electroencefalograma, sin embargo basta con el estudio clínico y el análisis de los síntomas para prescribir la farmacoterapia adecuada.

Aunque no se considera a esta enfermedad como incurable se requiere de un tratamiento de varios años e incluso puede prolongarse durante toda la vida del individuo.

Debido a las dramáticas manifestaciones de las crisis epilépticas, a través de la historia numerosos agentes han sido utilizados en la terapéutica; así una de las primeras sustancias utilizadas fué el ácido sulfúrico por Paracelsus (1493-1541). A principios del siglo XIX se utilizaban para el tratamiento de las epilepsias sales de zinc, cobre, iodo, morfina, opio y belladona entre otras.

En 1857 Sir Charles Lockock trató algunos pacientes con bromuro de potasio, el cual causa un decremento del tfbido, por lo cual suponía que curaría las epilepsias. (54)

En 1868 Clouston realizó un estudio cuidadoso, con el cual demostró la efectividad del bromuro de potasio, el trabajó con 29-pacientes epilépticos encontrando una disminución considerable de las crisis epilépticas después de la administración de éste.

En 1954 Holmes (Woodbury 1978) recalca que durante las últimas décadas del siglo XIX, 2.5 toneladas de bromuros fueron utilizadas por el Hospital Nacional de Londres, para el tratamiento de la epilepsia.

El siguiente paso en la terapia de los anticonvulsivos ocurrió en el año de 1912, cuando el fenobarbital fué introducido como un sedante. Hauptman en este mismo año, observó que los pacientes epilépticos a los cuáles habia tratado con fenobarbital, tenían una marcada disminución de las crisis, y algo importante es que tenían que usar dosis menores que las de los bromuros. (32)

Putman y Merrit en 1937 (Woodbury 1978), iniciaron una investigación sistemática de las drogas anticonvulsivas, probandolas en un gran número de animales de laboratorio, ellos incluyeron varias hidantoinas, por su estructura similar al fenobarbital y describieron que la difenilhidantoína era muy efectiva en la prevención de ataques inducidos por electricidad.

Swinyard y col. (Kopeloff 1960) comprobaron que la difenilhidantoína (DFH) puede estabilizar las descargas nerviosas anormales inducidas experimentalmente y que ocasionan convulsiones en ratón. (29)

Merritt y col. produjeron crisis convulsivas en gatos a los que posteriormente administraron por vía oral 200 mg. de DFH con lo que disminuían notablemente las crisis convulsivas aún cuando el estímulo se siguiera aplicando. Los mismos autores reportan síntomas de intoxicación severa con una dosis aproximada de 1/4 y 1/2 de la dosis letal mínima. (62)

En las últimas décadas diversas drogas han demostrado su utilidad en el tratamiento de las convulsiones como son: la carbamazepina, la primidona y el valproato de magnesio. Las dos primeras se utilizan desde 1952 y 1960 respectivamente. Sin embargo la DFH sigue siendo una de las más utilizadas.

7.1 Difenilhidantoina.

La DFH pertenece al grupo de las hidantoinas, presenta una estructura química que consiste en un anillo de 5 átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno, un grupo ferol en el carbono 5 y un doble enlace de oxígeno en el carbono dos (fig. 1).

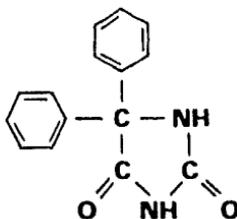


Figura 1

7.2 Farmacocinética.

a.- Absorción. Esta depende de su solubilidad lipídica, de su pKa, del pH del medio en el que se disuelve, del número de sitios receptores y de la concentración de ésta. Estos factores son a su vez afectados por el tipo de excipiente, el proceso de elaboración del medicamento y la ingestión de ciertos alimentos.

La absorción de la DFH en el tracto digestivo es muy lenta y no es muy buena, ésto se debe a que la DFH es extremadamente insoluble en el pH de los jugos gástricos (pH=2). (32)

Cuando la DFH pasa por el duodeno (donde el pH es aproximadamente de 7 a 7.5) la mayor parte de la droga está ionizada y es considerablemente más soluble en el fluido intestinal. Las sales biliares incrementan la solubilidad de la droga. En el duodeno el área de absorción es considerablemente grande y esta puede llevarse a cabo más rápidamente, es en este sitio donde la máxima absorción de la DFH ocurre.

b.- Distribución. Una vez en el sistema circulatorio la DFH se une rápidamente a las proteínas, en el hombre el promedio de unión es de 90% a 37°C. Esta unión se ve alterada por la cantidad de albúmina presente en el plasma. Se ha identificado por Radioinmunoanálisis (RIA) de suero humano que la DFH está unida a la albúmina y a la 2 alfa globulina. (32)

La DFH pasa a través de todas las membranas celulares por difusión no iónica, uniéndose la mayor parte de la droga a las fracciones subcelulares. Quince minutos después de su absorción, la droga ha alcanzado una distribución máxima.

La concentración de la DFH en el cerebro es de 1 a 3 veces la concentración de la droga total en plasma y cerca de 6 a 10 veces la concentración libre, esto se debe a la unión de la DFH con varias fracciones subcelulares del cerebro. (32)

c.- Metabolismo. Una vez introducida en el organismo la DFH es hidroxilada en el hígado, en uno de sus anillos fenoles, y se une con el ácido glucurónico formando un compuesto llamado 5 fenil-5 parahidroxifenilhidantoico (HPPH) y posteriormente se transforma en ácido alfa aminofenil acético. (38)

El metabolismo de la DFH se ve afectado por la presencia de otros fármacos tales como: el dicumarol, la isoniacida, las benzodiazepinas y las fenotiacinas. (23)

d.- Eliminación. La DFH y sus metabolitos son excretados en

orina y heces fecales. Menos del 5% de la droga total es eliminada en forma no metabolizada por orina y solo una pequeña cantidad por heces fecales.

En el hombre la cantidad excretada como HPPH es dependiente de la dosis. Cuando la administración es oral con una dosis de 100 mg. del 60 al 85% es eliminada como HPPH, a dosis de 250 mg el 76% y a dosis de 500 mg solo el 50%.

7.3 Niveles séricos y control de la dosis.

Los primeros métodos utilizados para determinar los niveles séricos fueron la espectrofotometría y la colorimetría, posteriormente se introdujo la cromatografía de gases. En la actualidad el método más utilizado es el del radioinmunoanálisis. (RIA)

En el tratamiento monoterapéutico de la DFH la dosis más frecuentemente utilizada es de 300 mg diarios en adultos, con esta dosis después de un tiempo determinado, el cual varía de 5 a 15 días, se estabilizan los niveles séricos, lo que implica que la cantidad de medicamento que se está tomando y la que se está eliminando alcanza un equilibrio (31).

Los niveles séricos de 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$, se encuentran frecuentemente en pacientes que tienen un buen control, sin embargo se han encontrado pacientes que tienen niveles séricos de 30 $\mu\text{g/ml}$, sin que sus crisis hayan sido controladas y sin ellos presentar síntomas de intoxicación. Por el contrario, algunos pacientes con niveles séricos de 5 $\mu\text{g/ml}$, presentan síntomas de intoxicación, como son: nistagmus y somnolencia. (31)

Estas variaciones individuales se deben a la manera de metabolizar a la droga. Una falla en la enzima difenilhidantoinasa altera las uniones proteicas y el descenso de estas uniones produce cambios en la eliminación, metabolismo y concentración de ésta en plasma. (11)

Los niveles séricos bajos en sangre están dados por un rápido metabolismo de la droga y un desplazamiento competitivo, por lo

que aumenta la fracción libre en plasma, lo cual provoca un incremento en el metabolismo de ésta (38); los niveles séricos muy bajos también pueden ser causados por una baja absorción de la droga.

La DFH a altas concentraciones reduce la excitabilidad y estabiliza las fibras nerviosas después de la hiperexcitabilidad, -- causada por las bajas concentraciones de calcio iónico. Se ha demostrado que estos cambios ocurren en el cerebro. Estas diferencias de concentración causarían un relajamiento del potencial de -- membrana. Noodbory ha calculado que la DFH cambia el potencial de membrana cerca de un 20% (Woodbory 1978), esto es importante para reducir la excitabilidad nerviosa y para incrementar el umbral de excitación en la misma células.

7.4 Toxicidad clínica.

Merritt y Putman en el mismo año que descubrieron la DFH reportan dos casos de intoxicación en 350 pacientes , y describen 5- categorías de efectos tóxicos:

a.- Disturbios gastrointestinales, como gastritis con náusea y vómito.

b.- Alteraciones del sistema nervioso central caracterizado por nerviosismo, ataxia, nistagmus y ocasionalmente diplopia.

c.- Efecto hematológicos como leucositosis.

d.- hipertrofia de encías en un 6%.

e.- Complicaciones dermatológicas como eritematoso multiforme, descamación y leucositosis.

En 1961 Roseman (Woodbury 1978), reporta una asociación -- del incremento de síntomas como ataxia, vértigo, euforia y depresión, con la intoxicación de la DFH.

En ciertos pacientes se ha descrito el síndrome de la difenilhidantoina encefalopática que se caracteriza por un incremento de las crisis, cambios en el electroencefalograma (EEG) y alteraciones en las funciones mentales. Estas reacciones son poco usuales y pueden causar confusión en el diagnóstico, por lo general se

asocian con sobredosis, pero pueden presentarse en pacientes que tienen niveles séricos establecidos. Estos enfermos desarrollan -- disturbios en las funciones normales, con un incremento de las des cargas registradas en el EEG, signos neurológicos como hemiparesis y un déficit hemisensorial. (31)

Se ha reportado el desarrollo de hemiplejia en dos pacientes tratados durante 6 meses y dos años respectivamente con DFH.-- (32)

En 1969 Logan y Freeman describen reacciones semidegenerativas asociadas con intoxicación de DFH, asimismo reportan 4 epilépticos con signos de deterioro cerebral, en ellos los niveles séricos estaban arriba de 30 μ g/ml, pero no presentaban un incremento en las convulsiones y tampoco presentaban nistagmus.

Se ha observado que algunos pacientes desarrollan reacciones de hipersensibilidad, inicialmente con urticarias y linfodenopatías, estos síntomas desaparecen después de suspender la DFH pero pueden volver a aparecer con la readministración.

Cabe señalar que las complicaciones anteriores son poco frecuentes. (62)

7.5 Teratogénesis.

Hanson y Smith en 1975 (21) describen un patrón de malformaciones en los hijos de madres epilépticas tratadas con DFH, a este patrón se le llamó síndrome de la difenilhidantoína y se caracteriza por: fontanela anterior amplia, hipertelorismo ocular, puente nasal deprimido, orejas de implantación baja, labio leporino, paladar hendido, hipoplasia de falanges y uñas, pulgar alargado, dislocación de la cadera, así como cuello corto, anomalías en las costillas, implantación baja de pelo, bajo peso al nacer e inteligencia abajo de lo normal.

Ocasionalmente se ha reportado braquicefalea, estrabismo, - coloboma, estenosis cortical, atresia duodenal, sinfalangismo y -- sindactilia.

Diverosos estudios han reportado la presencia de este patrón de malformaciones en los hijos de madres epilépticas tratadas durante el embarazo con DFH. (26)

Lewin en 1973 (37) y Massino en 1974 (41) al estudiar 22 niños recién nacidos, hijos de madres epilépticas, 15 de las cuales estuvieron tratadas con DFH, observaron en 9 de ellos una reducción en la eritropoyesis, con algunas malformaciones congénitas, - 10 con anormalidades cromosómicas y en 7 casos no encontraron ninguna alteración genética ni teratogénica. El análisis cromosómico de las madres mostró solo en una de ellas, alteraciones en el complemento diploide. (41)

Bishum (6) reporta un aumento en la frecuencia de células hipotetraploides, tetraploides, en recién nacidos cuyas madres fueron tratadas con anticonvulsivos.

A finales de los setenta, Metzelf (43), propone que el efecto teratogénico de la DFH se debe a la actividad antagonica de este producto sobre el metabolismo del ácido fólico, ya que los inhibidores del folato inducen la producción de alteraciones teratogénicas, semejantes a las producidas por la DFH.

7.6 Mutagénesis de la DFH.

a) Evidencias citogenéticas. Tratando de correlacionar la presencia de alteraciones cromosómicas con la administración de la DFH, se han realizado estudios, los cuales analizan las evidencias causadas por dicho fármaco.

Uno de los primeros trabajos fué el de Muniz y col. (Lewin-1973) quienes reportan que en cultivos de linfocitos tratados con dosis tóxicas de DFH, aumentan el número de aberraciones cromosómicas pero al evaluar el daño citogenético en linfocitos de 7 pacientes tratados con el mismo producto, no se observaron alteraciones.

En 1970 Márquez Monter y col. (40) estudió los cromosomas obtenidos del cultivo de linfocitos de sangre periférica de 20 pacientes epilépticos tratados con DFH, en dosis de 200 a 400 mg. --

diarios, durante un periodo mínimo de un año, observando un aumento en la frecuencia de células hipo e hipertetraploides, efectos ausentes en los testigos.

Brogger en 1970 (8) estudia el efecto de las drogas anticonvulsivas, en mujeres que estuvieron bajo tratamiento y en sus hijos encontrando un aumento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas con respecto al control, sin embargo, ya que los pacientes -- recibieron diversas drogas anticonvulsivas, no fué posible determinar si una o varias drogas causaron este efecto.

En un estudio posterior Bishum (6) intoxicó cultivos de linfocitos humanos con DFH, primidona y fenobarbital, a dosis de 20, - 30, 40, 50, 60 y 70 ug/ml., obteniéndose resultados negativos en el estudio cromosómico.

Herha y Obe en 1976 (23), estudian 10 pacientes epilépticos con monoterapia de carbamazepina y 14 con DFH, observando en el primer caso una elevada frecuencia de translocaciones y en el segundo de cromosomas dicéntricos.

Alving y col. (2) y Sakari y col. (56), estudiaron células de médula ósea procedente de 10 y 22 pacientes tratados con DFH, en el primer caso no observaron alteraciones cromosómicas pero si un incremento de micronúcleos con respecto al control, en el segundo caso las aberraciones cromosómicas no se incrementaron comparandolas con los controles. Estos mismos autores estudian el efecto de la DFH en ratones tratados con dosis de 50 mg/kg. durante tres días, también evaluaron la adición de la droga a cultivos de linfocitos - obteniéndose resultados negativos en ambos experimentos.

Habeňank y col. (20), estudiaron 30 niños epilépticos bajo - tratamiento monoterapéutico de DFH, encontrando que los intercambios de cromátidas hermanas se incrementaban notablemente en comparación con los resultados del grupo control, todos presentaron cariotipos normales.

Eber y col. (14), estudiaron 20 niños tratados con DFH y 10 con primidona, de ellos se llevó el control de los niveles séricos,

ninguno presentó síntomas de intoxicación, no encontrándose diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) entre ambos grupos como entre el grupo control.

Hunke y Carpenter en 1978 (25), estudiaron la frecuencia de ICH en linfocitos humanos expuestos "in vitro" a DFH, no encontrándose diferencias significativas.

Recientemente con la finalidad de demostrar el efecto mutagénico de la DFH y su metabolito más común la 5 hidroxifenilhidantoina, Sezzano y col. observaron en el sistema de Ames que a una mayor hidroxilación de la DFH se obtiene un incremento en su efecto mutagénico.

b.- Intercambio de Cromátidas Hermanas.

Técnicas autoradiográficas. La primera en trabajar con ICH fué Barbara Mc Clinton (1938) (Wolff 1982). Posteriormente en 1957 Taylor y col. (Wolff 1982), describen la técnica autoradiográfica de los cromosomas metafásicos, usando la incorporación de timidina tritiada (TH^3), para demostrar la distribución semiconservativa -- del ADN duplicado entre las dos cromátidas. Esta técnica consiste en extender en las células que incorporar TH^3 , una emulsión fotográfica sensible a los rayos beta emitidos, contenidos en la timina. Por cada emisión de una partícula beta se ve aparecer un gránulo de plata reducido después del revelado de la emulsión por cada gránulo de plata correspondiente a un átomo radioactivo incorporado.

Este método no fué aceptado, ya que la observación se dificultaba por los precipitados de plata que se observaban en los cromosomas, pudiendo quedar enmascarados algunos intercambios.

Técnicas de fluorescencia o métodos no autoradiográficos.-- Ward y col. en 1969 (Wolff 1982), describieron dos compuestos fluorescentes, el formicín y la diazenebularina. Otros compuestos utilizados en estas técnicas son: el naranja de acridina, la mostaza

de quinacrina, la bromodesoxiuridina y la flouodesoxiuridina.

La desventaja de estas técnicas es que la fluorescencia de los compuestos incorporados en el ADN es efímera y las preparaciones obtenidas no son permanentes.

Latt en 1974 (34) observó la sustitución de timina por la 5 bromodesoxiuridina (5 Brdu) en los cromosomas obtenidos de un cultivo de sangre periférica, estos cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de 5 Brdu.

Si se cultivan células en presencia de Brdu durante el primer ciclo de replicación celular, cada filamento de la doble hélice de ADN sintetiza su filamento complementario utilizando esta base. Durante la primera mitosis las cromátidas hermanas del cromosoma metafásico, no se distinguen entre sí, ya que tienen la misma composición química. Sin embargo si se deja seguir por un segundo ciclo la replicación y por lo tanto una segunda síntesis de ADN, una de las cromátidas resultantes será híbrida, al igual que las obtenidas en el primer ciclo celular, mientras que la otra tiene ambas cadenas del ADN con 5 Brdu en lugar de timina. En este momento las cromátidas hermanas son químicamente diferentes, lo que puede ponerse de manifiesto por la tinción diferencial que dan ambas cromátidas cuando se colorean con Hoescht 33258, un derivado de la bisbinzimidida. Los cromosomas así teñidos muestran una cromátida con intensa fluorescencia, que es la que posee un solo filamento reemplazado con Brdu y la otra en que la fluorescencia es más pálida, que corresponde a la cadena que ha incorporado Brdu en ambos filamentos. Posteriormente la preparación cromosómica es expuesta a la luz negra o a la luz solar y posteriormente se colorea con Giemsa, de esta manera se obtienen preparaciones permanentes de más fácil observación, que no necesitan de equipo costoso, como un microscopio de fluorescencia y que no representan el inconveniente de la temporalidad limitada de los colorantes fluorescentes.

Mecanismos de formación de los ICH.

Los ICH son un fenómeno que se relaciona con los mecanismos

de reparación del ADN. El mecanismo de formación no se conoce con certeza. Su importancia práctica es que la frecuencia se ve afectada por tratamientos como luz ultravioleta o mutágenos químicos, por lo cual el número de ellos puede ser utilizado como una prueba de sensibilidad para mutagénesis.

Los ICH no deben considerarse como un daño cromosómico en el sentido estricto de la palabra ya que la morfología cromosómica no se ve alterada.

Wolff en 1977 (60), presentó evidencias de que los ICH resultan de una lesión persistente que pudo ser inducida en cualquier tiempo del ciclo celular, y para que se haga evidente un intercambio es necesario que la célula lesionada pase por la fase de síntesis para poder observarlo en la siguiente mitosis.

Como se mencionó anteriormente los mecanismos de formación se desconocen casi por completo, se han propuesto varios tipos de éstos y el más aceptado hasta la fecha es el propuesto por Painter en 1982 (50), él postula que la molécula de ADN tiene una replicación asincrónica. El lugar donde se inicia se llama replicón, cada 20 replicones forman lo que se conoce como racimo y cada 5 racimos se forma una asa. Las asas están unidas entre sí por ARN y proteínas. Dentro de las asas encontramos replicones en diferentes estados de replicación, por lo que cuando una asa está replicada y la siguiente no, los puntos de unión entre ellas son sometidos a una gran tensión y se vuelven muy vulnerables, en estos lugares es donde se llevan a cabo los rompimientos de la cadena de ADN, estos rompimientos son de doble banda y están catalizados por la enzima topoisomerasa II la cual ayuda a desespiralizar la cadena de ADN.

Los rompimientos posteriormente desaparecen por la reunión de las cadenas hijas originales replicadas, observándose de esta manera la tinción diferencial.

Estudios de ICH en poblaciones expuestas,

Desde el desarrollo de las nuevas técnicas para la tinción diferencial entre las cromátidas hermanas en cromosomas en metafase

se, estos métodos han sido muy utilizados para el análisis de ICH en células expuestas a agentes genotóxicos.

Se han realizado numerosos estudios en cuanto al incremento de la frecuencia de ICH en poblaciones expuestas ocupacionalmente a sustancias tóxicas, como solventes orgánicos. (61)

En 1978 Lambert (Wolff 1982), estudió un grupo de trabajadores de la industria farmacéutica y observó que la frecuencia de ICH se elevaba en comparación con los sujetos controles.

Calleman (Wolff 1982), estudió 5 mujeres trabajadoras de una planta esterilizadora, expuestas a óxido de etileno, en ellas la frecuencia de ICH se incrementó considerablemente, encontrándose también que dos de ellas desarrollaron posteriormente leucemia.

Baden y Simons en 1980 (Wolff 1982), estudiaron la mutagenicidad producida por la constante inhalación de anestésicos, principalmente en personas que laboran en quirófanos, encontrándose la frecuencia de ICH elevada, más de lo normal, también se encontró un incremento en la frecuencia de abortos y malformaciones congénitas y cáncer en estos individuos.

Bala y Hopkin en 1980 (Wolff 1982), observaron que la frecuencia de ICH en fumadores se incrementaba en un 20% en una población de 209 individuos. El 10% de los fumadores, tenían una frecuencia de 22 ICH/metafase o más, valores no observados en los no fumadores, esta elevación refleja algún daño causado en el material genético inducido "in vivo".

Maki y Paakkanne en 1980 (Wolff 1982), estudiaron 32 retrograbadores, los cuales tenían una exposición diaria al tolueno y no encontraron diferencias en la frecuencia de ICH comparadas con los sujetos controles no expuestos.

Inducción de ICH por medicamentos "in vivo".

Hay pocos estudios en poblaciones expuestas a radioterapia o quimioterapia, entre los que se pueden señalar los estudios de Stent y col. (1979), los cuales demostraron que el tratamiento con PUVA ha causado un desconcierto en el riesgo genético que puede in

volucrar, ya que aumentó el riesgo de contraer carcinoma cutáneo - sin embargo no produce un aumento en la frecuencia de ICH en pa--- cientes tratados.

Nicholas estudió 31 individuos con intoxicación aguda al - malation, encontrándose que la frecuencia de ICH aumenta en un 20% con respecto a el grupo control. (Wolff 1982)

Kowalcsyc en 1980 (30), estudió la toxicidad genética del - metronidazol y del ácido nalidixico en niños expuestos a estos me- dicamentos encontrándose un aumento de más del doble de ICH.

Wolff (60), estudió pacientes tratados con sulfasalicina -- (medicamento prescrito en el tratamiento de la colitis ulcerativa) encontrando que los ICH no se incrementaban comparandolos con el - grupo control.

III MATERIAL Y METODO.

Se realizó el cultivo de linfocitos para el análisis citogenético de 10 pacientes epilépticos procedentes de la clínica de epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, seleccionados por encontrarse bajo un tratamiento monoterapéutico a base de difenilhidantoina, prescrita oralmente por un periodo mínimo de un año. De este grupo 6 correspondieron al sexo femenino y 4 al sexo masculino, con un rango de edades comprendido entre 17 a 63 años con un \bar{X} = 34.87 años (tabla 1).

A la exploración física y neurológica los pacientes presentaron características normales, con excepción de la presencia de crisis convulsivas. El registro electroencefalográfico presentó -- las anomalías características de este padecimiento.

De cada uno de los casos estudiados se tomó una muestra de 20 ml. de sangre periférica, de los cuales 15 ml fueron enviados - al laboratorio de Radioinmunoanálisis (RIA del I.N.N.N.), para la - determinación de la concentración del anticonvulsivo en el plasma sanguíneo. Con los 5 ml. restantes se efectuó el cultivo de linfocitos de sangre periférica para el estudio cromosómico.

Como testigo se efectuaron los cultivos de sangre procedente de 7 donadores sanos (quienes hasta el momento del estudio no presentaron crisis convulsivas y nunca habían tomado ningún anti--convulsivo). Cuatro fueron del sexo femenino y 3 del sexo masculino, con un \bar{X} de edades = 30.25 años.

Cultivo de sangre periférica.

La siembra de las células sanguíneas se hizo de acuerdo a - la técnica de Moorhead y col. en 1960 (45), con algunas modificaciones, de la siguiente manera: se sembraron .5 ml de sangre total de cada uno de los pacientes, así como de los individuos del grupo control, en 5 ml. de medio de cultivo RPMI 1640. A cada cultivo se le adicionaron 50 unidades de penicilina y 50 ug de estreptomycin (Gibco), 0.5 ml de fitohemaglutinina (Microlab) y 30 ug de 5 Brdu. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 y 72 Hrs. Dos horas an

tes de la cosecha se adicionó colchicina (2ug/ml).

La separación de las células se obtuvo centrifugando durante 10 minutos a 1200 RPM, eliminando el sobrenadante y dejando un volumen igual al del botón o paquete celular. Se resuspendió suavemente y se agregaron 5 ml. de solución hipotónica 0.07 M de KCl), - incubándose después a 37°C durante 10 min., una vez transcurrido - este tiempo, se centrifugó de nuevo a 1200 RPM durante 10 min, se eliminó el sobrenadante dejando un volumen igual al del botón, para resuspender nuevamente a las células antes de agregar 5 ml. de fijador (ácido acético-metanol 3:1). Después de resuspender nuevamente en el fijador se dejaron reposar las células durante 20 min. Esta operación se volvió a repetir hasta observar que el botón estuviera lo más limpio posible, lo que generalmente ocurrió en el - tercer cambio. Por último se procedió a la elaboración de las lamini-llas fijando a la flama.

Transcurridas 24 Hrs de haber sido elaboradas las lamini-llas se procedió a su tinción, para evidenciar a las cromátidas --hermanas, utilizando la técnica descrita por Perry y Wolff (60) de fluorescencia más Giemsa. Esta consiste en introducir las lamini-llas en una cajade Koplín que contiene 50 ml. de agua destilada y- 0.25 ml de tintura de Hoescht 33258 durante 30 min, transcurrido - este tiempo se lavan con agua corriente y se secan al aire, se cubren con amortiguador de fosfatos pH=6.8 y cubreobjetos, se exponen a la luz negra de 2.30 a 3.0 Hrs y finalmente se tiñen con una solución 1% de Giemsa-Buffer de fosfatos pH=7, durante dos minutos eliminando el exceso de colorante con agua corriente.

En el estudio cromosómico, la cinética de la proliferación- celular se cuantificó en las 100 primeras metafases observadas, de terminando el número de primeras, segundas y terceras divisiones - celulares. El número de aberraciones se determinó a su vez en 100- metafases, provenientes de células en primera división, con cromosomas bien esparcidos, y finalmente la frecuencia de intercam- --bios de cromátidas hermanas se evaluó en 25 metafases de células -

en segunda división.

Los resultados en cada población fueron comparados aplicando la prueba de T de Student.

IV RESULTADOS.

La determinación de los niveles séricos en el grupo de los 10 pacientes dió como resultados, en 8 de ellos una concentración promedio de 8.1 ug/ml. con un rango de 3.8 a 22.0 ug/ml. (terapéutico normal): de los dos casos restantes, en uno el valor fué de 0.0 ug/ml y en otro no se pudo efectuar la determinación por un problema técnico durante la toma de muestra. (Tabla 1)

Análisis cromosómico.

La tabla N°2 muestra los resultados de la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas en las células en metafase procedentes de los cultivos de linfocitos de los donadores sanos (controles), observandose una frecuencia promedio de 3.37% de células con la presencia de diversas alteraciones, tanto cromosómicas como cromatídicas.

En la tabla N°3 se presentan los resultados de la frecuencia de cromosomas anormales en el grupo experimental, observandose un promedio de 8.1% con un rango de 4 a 13%, siendo valores mayores a los del grupo control. Anomalías tanto de tipo cromosómico como cromatídico se presentaron en todos los pacientes, encontrándose en uno de ellos un cromosoma dicéntrico, en otro un cromosoma tetradial y en dos algunas células con endoreduplicaciones. Los valores obtenidos para cada una de las poblaciones fueron comparados aplicando la prueba de T-Student, no obteniéndose diferencias significativas.

El análisis de la frecuencia de ICH/metafase en el grupo control se observa en la tabla N°4, el rango de este grupo, en un total de 700 células analizadas, estuvo comprendido entre 4.12 y 5.58 con un promedio de 4.7. Los resultados del mismo estudio en los pacientes para 1000 células estudiadas, estuvieron comprendidos en un rango de 4.16 a 8.40 ICH/metafase con un promedio de 6.52, según se muestra en la tabla N°5. Para comparar estadística-

mente los resultados de ambas poblaciones se aplicó la prueba de T-Student, no obteniéndose diferencias significativas, sin embargo al graficar el N° de ICH contra el número de metafases de ambos -- grupos se pudo observar una diferencia en su distribución, distinguiéndose en el grupo experimental una curva bimodal con dos umbrales, uno semejante al control a nivel de 4 ICH/metafase y otro en 8 ICH/metafase, lo cual concuerda con el promedio de los rangos obtenidos en cada grupo, que en el caso del control fué de 1.8 a 7.8 mientras que en el grupo de los pacientes fué de 3.8 a 11.1, como se aprecia en la figura N°2.

En las tablas N°6 y N°7 se presentan los datos de la cinética de la proliferación celular, en el cual se evaluó el porcentaje de las primeras, segundas y terceras divisiones, tratando de determinar si existía un efecto de este farmaco a nivel del ciclo celular, comparando los valores del grupo control con los del grupo experimental. En el primero se obtuvo un promedio de 23.71% de células en primera división, 41.25% en segunda y 34.57% en tercera división, en la población de los pacientes los promedios fueron de 38.75%, 38.10% y 20.90% respectivamente para los diferentes estadios de la división celular, presentándose aparentemente por el incremento de las primeras divisiones y el decremento de las terceras, un ligero retraso en el ciclo celular (Fig N°3), sin embargo al evaluarse estas diferencias no fueron significativas.

| CASO No | SEXO | EDAD (AÑOS) | DOSIS DFH (MG) | NIVELES SERICOS (UG/ML) |
|---------|-------|----------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | MASC | 19 | 300 | 11.00 |
| 2 | FEM | 41 | 400 | 7.6 |
| 3 | MASC | 65 | 300 | 6.8 |
| 4 | FEM | 28 | 200 | 4.7 |
| 5 | FEM | 19 | 430 | 22.0 |
| 6 | FEM | 33 | 300 | - |
| 7 | FEM | 29 | 300 | 3.8 |
| 8 | MASC | 63 | 300 | 5.4 |
| 9 | FEM | 10 | 230 | 0.0 |
| 10 | MASC. | 17 | 300 | 3.8 |

TABLA 1.

SEXO, EDAD Y METABOLISMO DE LA DFH EN 10 PACIENTES
EPILEPTICOS.

| CASO No | \bar{X} I.C.H./METAFASE | TOTAL DE CELULAS ABERRANTES | A. CROMOSOMICAS | | | A. CROMATIDICAS | | |
|---------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|-------|--------|-----------------|--------|--|
| | | | DIC | G" r" | otras. | G' r' | otras. | |
| 1 | 4.48 | 4% | | 2 | | | 2 | |
| 2 | 5.58 | 5% | | 2 | | | 3 | |
| 3 | 4.12 | 4% | | 2 2 | | | | |
| 4 | 5.12 | 3% | | | | | 3 | |
| 5 | 4.32 | 3% | | | | | 1 2 | |
| 6 | 4.36 | 3% | | 1 | | | 1 1 | |
| 7 | 5.40 | 4% | | 1 1 | | | 2 | |
| | $\bar{X}= 4.77$ | $\bar{X}= 3.37\%$ | | | | | | |

DIC = Cromosomas dicéntricos.
 G" = Gaps cromosómicos.
 r" = Rompimientos cromosómicos.
 G' = Gap cromatídico
 r' = Rompimiento cromatídico.

TABLA 2 FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS DE 7
 DONADORES "SANOS".

| CASO No | N.S. | \bar{X} I.C.H/ME TAFASE. | TOTAL DE CELULAS ABERRANTES. | A. CROMOSOMICAS | | | A. CROMATIDICAS | | | |
|---------|------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|----|----|-----------------|----|----|---------------|
| | | | | DIC | G" | r" | otras | G' | r' | otras |
| 1 | 11.0 | 4.16 | 8% | | | | 5 | 1 | 2 | |
| 2 | 7.6 | 6.88 | 9% | 1 | | | 1 | 2 | 5 | |
| 3 | 6.8 | 8.36 | 7% | | 1 | 1 | | 1 | 3 | tetradar. |
| 4 | 4.7 | 5.96 | 4% | | 1 | 2 | | 1 | | |
| 5 | 22.0 | 6.76 | 8% | | | | 4 | 1 | 3 | |
| 6 | - | 8.40 | 9% | | | | 3 | | 4 | |
| 7 | 3.8 | 7.80 | 9% | | | | 7 | 1 | 1 | Endor. (2) |
| 8 | 5.4 | 7.44 | 7% | | | | 3 | 1 | 3 | |
| 9 | 0.0 | 5.28 | 7% | | 1 | 1 | | 4 | 1 | |
| 10 | 3.8 | 4.20 | 13% | | 1 | 7 | Endor. | 1 | 3 | |
| | | $\bar{X}=6.52$ | $\bar{X}=8.1\%$ | | | | | | | |

DIC = Cromosomas dicentricos.
 G" = Gap cromosómico.
 r" = Rompimiento cromosómico.
 Endo= Endoreduplicación.
 G' = Gap cromatídico.
 r' = Rompimiento cromatídico.
 Tetra = Cromosoma tetradial.

TABLA 3 FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 10 PACIENTES TRATADOS MONOTERAPEUTICAMENTE CON D.F.H.

| CASO No | TOTAL DE CROMOSOMAS | TOTAL DE I.C.H. | \bar{X} I.C.H./CROMOSOMAS | \bar{X} I.C.H./METAFASE | RANGO I.C.H | D.S./METAFASE |
|---------|---------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|---------------|
| 1 | 1147 | 112 | 0.197 | 4.48 | 0 - 10 | 2.26 |
| 2 | 1148 | 147 | 0.128 | 5.58 | 4 - 9 | 1.52 |
| 3 | 1147 | 103 | 0.189 | 4.12 | 2 - 7 | 1.14 |
| 4 | 1146 | 128 | 0.111 | 5.20 | 3 - 8 | 2.25 |
| 5 | 1148 | 108 | 0.194 | 4.32 | 2 - 7 | 1.35 |
| 6 | 1147 | 106 | 0.095 | 4.36 | 1 - 7 | 1.51 |
| 7 | 1148 | 135 | 0.117 | 5.40 | 3 - 7 | 1.61 |

D.S. = Desviación estandar.

TABLA 4 FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDAS EN 7 DONADORES SA--NOS.

| CASO No | TOTAL DE CROMOSOMAS | TOTAL DE I.C.H. | \bar{X} I.C.H./CROMOSOMA | \bar{X} I.C.H./METAFASE. | RANGO I.C.H. | D.S./METAFASE |
|---------|---------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------|---------------|
| 1 | 1147 | 172 | 0.149 | 6.88 | 4 - 13 | 2.58 |
| 2 | 1148 | 149 | 0.129 | 5.96 | 3 - 13 | 2.06 |
| 3 | 1148 | 169 | 0.147 | 6.76 | 4 - 14 | 2.12 |
| 4 | 1147 | 210 | 0.183 | 8.40 | 4 - 10 | 1.86 |
| 5 | 1147 | 195 | 0.170 | 7.80 | 4 - 11 | 2.02 |
| 6 | 1145 | 132 | 0.115 | 5.28 | 5 - 13 | 2.25 |
| 7 | 1150 | 104 | 0.090 | 4.16 | 5 - 13 | 2.18 |
| 8 | 1150 | 209 | 0.181 | 8.36 | 4 - 13 | 2.78 |
| 9 | 1146 | 154 | 0.134 | 7.44 | 2 - 9 | 2.00 |
| 10 | 1145 | 105 | 0.090 | 4.20 | 2 - 9 | 1.82 |

D.S. = Desviación estandar

TABLA 5 FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDAS EN 10 PACIENTES EPILEPTICOS CON TRATAMIENTO MOMOTERAPEUTICO A BASE DE DIFENILHIDANTOINA.

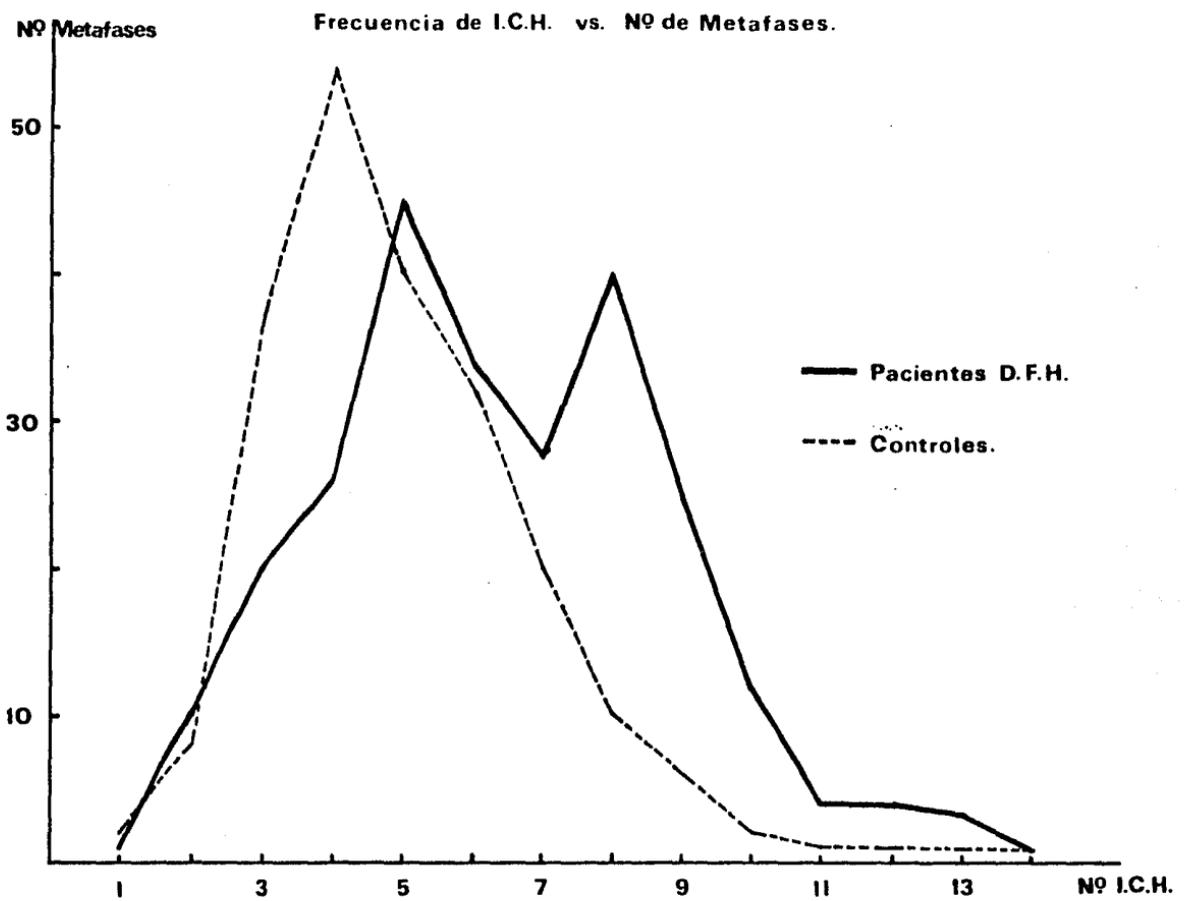


FIGURA Nº 2

| CASO N° | N° DE METAFASES | CELULAS EN | | |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 1A DIVISION | 2A DIVISION | 3A DIVISION |
| 1 | 100 | 15 | 37 | 48 |
| 2 | 100 | 23 | 37 | 40 |
| 3 | 100 | 22 | 42 | 36 |
| 4 | 100 | 36 | 44 | 20 |
| 5 | 100 | 26 | 40 | 34 |
| 6 | 100 | 18 | 43 | 39 |
| 7 | 100 | <u>26</u> | <u>49</u> | <u>25</u> |
| | | $\bar{x} = 23.61$ | $\bar{x} = 41.25$ | $\bar{x} = 34.57$ |

TABLA 6 FRECUENCIA DE 1A, 2A Y 3A DIVISIONES A LAS 72 HRS. EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS DE 7 DONADORES "SANOS".

| CASO N° | N° DE METAFASES | CELULAS EN | | |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 1A DIVISION | 2A DIVISION | 3A DIVISION |
| 1 | 100 | 13 | 53 | 34 |
| 2 | 100 | 29 | 50 | 21 |
| 3 | 100 | 29 | 37 | 34 |
| 4 | 100 | 44 | 38 | 18 |
| 5 | 100 | 70 | 20 | 10 |
| 6 | 100 | 75 | 18 | 7 |
| 7 | 100 | 36 | 43 | 21 |
| 8 | 100 | 18 | 53 | 29 |
| 9 | 100 | 37 | 45 | 18 |
| 10 | 100 | 30 | 53 | 17 |
| | | $\bar{x} = 30.85$ | $\bar{x} = 38.10$ | $\bar{x} = 20.90$ |

TABLA 7 FRECUENCIA DE 1A, 2A Y 3A DIVISIONES A LAS 72 HRS EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS DE 10 PACIENTES EPILÉPTICOS TRATADOS CON DFH.

Proliferación Celular.

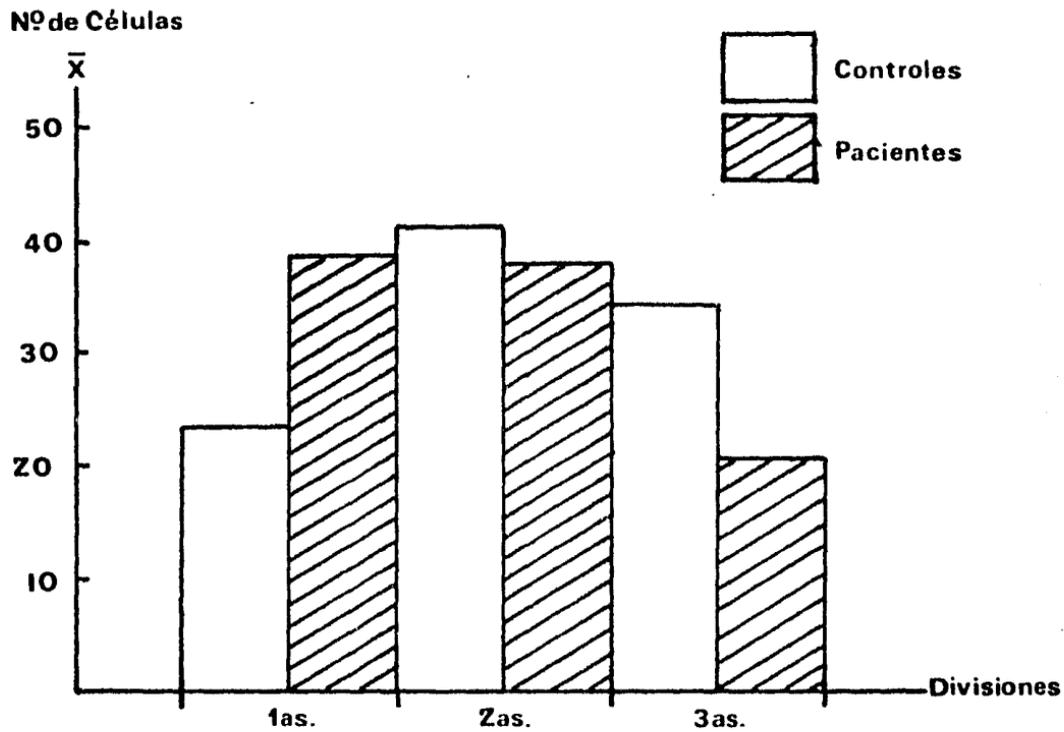


FIGURA Nº 3

| | N° DE CELULAS EVALUADAS PA RA ABERRACIO NES CROMOSO MICAS. | % DE CELULAS ANORMALES - EN PRIMERA- DIVISION. | N° CELULAS - ANALIZADAS - PARA I.C.H. | \bar{x} I.C.H./META- FASE. | PROLIFERACION CELULAR. (DIVISIONES) | | |
|-----------|--|---|---|------------------------------------|--|-------|-------|
| | | | | | 1as | 2as | 3as |
| CONTROLES | 700 | 3.37% | 165 | 4.77 | 23.61 | 41.25 | 34.57 |
| PACIENTES | 1000 | 8.10% | 250 | 6.52 | 38.75 | 38.10 | 20.90 |

TABLA 8

EFFECTOS GENOTOXICOS DE LA DIFENILHIDANTOINA (RESUMEN DE DATOS)

| REFERENCIA | # INDIVIDUOS | | DOSIS DE DFH (mg) | NIVELES SERICOS | TIEMPO COSECHA | TIPO DE CELULAS | % DE ABE- RRACIONES | | PRUEBA ES TADISTICA |
|-------------------------------|--------------|-----------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|------|------------------------|
| | TRATADOS | CONTROLES | | | | | TRAT | CONT | |
| HERHA Y OBE (23) | 14 | 20 | 220 a 1626 | NORMALES | 48 HRS 72 HRS | Linfocitos | 9% | 1% | SIGNI- FICATIVA |
| MARQUEZ-MONTER Y COL. (40) | 20 | - | 200 a 400 | - | 72 HRS | Linfocitos | 11% | 2% | SIGNI- FICATIVA |
| EBER Y COL. (14) | 10 | 6 | 4.4 a 7.7 | NORMALES | 72 HRS | Linfocitos | 3% | 1.5% | NO SIGNI- FICATIVA. |
| BARTCH (4) | - | - | - | - | - | Linfocitos | 4% | 3% | NO SIGNI- FICATIVA. |
| KNWTHLAS (28) | 22 | 20 | 130 | NORMALES | 4-6 HRS | Médula ó- sea. | 5.4% | 3.8% | NO SIGNI- FICATIVA. |
| ALVING Y COL. (2) | 10 | 10 | - | NORMALES | 12 HRS 60 HRS | Médula O. Linfocitos | .08% | .04% | NO SIGNI- FICATIVA. |
| STENCHEVER. (58) | 2 | 2 | 10 | - | - | Linfocitos | 7% | 7% | NO SIGNI- FICATIVA. |
| HABEDANK (20) | 9 | 9 | - | NORMALES | 72 HRS | Linfocitos | I.C.H. 10.30 6.49 | | SIGNI- FICATIVA. |
| HUNKE (25) | 4 | 4 | - | NORMALES | 72 HRS | Linfocitos | | | NO SIGNI- FICATIVA |

TABLA 9 COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS POR DIVERSOS AUTORES.

V DISCUSION.

En el presente estudio nos propusimos evaluar la genotoxicidad de la DFH. Para ello se probaron sus efectos en 10 pacientes - epilépticos (10 a 63 años de edad) tratados con la droga por diferentes períodos de tiempo. Como testigos se utilizaron 7 individuos sanos (23 a 51 años). Los parámetros que se evaluaron en este trabajo fueron la cinética de la proliferación celular, el porcentaje y tipo de aberraciones cromosómicas y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.

Cinética de la proliferación celular.

La cinética de la proliferación celular como un parámetro - adicional en las pruebas de mutagenicidad, en cultivos de linfocitos ha sido introducida recientemente. Se ha reportado que varía - en función de las condiciones de cultivo, la edad de los donadores y la adición de sustancias químicas.

Los datos obtenidos con respecto a la cinética de la proliferación celular, muestran que a pesar de haberse mantenido las -- condiciones de cultivo lo más similar posible, el mismo lote de -- sustancias, se presentan diferencias notables en el porcentaje de células en primera, segunda, tercera y sucesivas divisiones.

Esta variabilidad en la cinética de la proliferación celular ha sido descrita por Ferguson y Gaulden en 1983 (15').

Los datos del ciclo celular en los pacientes tratados con - DFH muestran cierta variabilidad, y en conjunto tienden a mostrar un ligero alargamiento de este ciclo, que se refleja en un incremento en el número de primeras divisiones este incremento no es sin embargo, estadísticamente significativo. Cabe señalar que el parámetro de cinética de proliferación celular requiere de un mejor conocimiento para que pueda ser estudiado como un índice de mutagenicidad "in vivo", ya que existiendo grandes diferencias individuales pueden compararse los resultados obtenidos en un grupo control

con los obtenidos en un grupo tratado. El estudiar el mismo grupo de individuos antes y después del tratamiento, también es objetable, ya que no existe información acerca de si este valor se mantiene constante a través del tiempo y cuales son los factores que pueden producir cambios en los valores que se obtienen.

Intercambio de cromátidas hermanas.

Con respecto a los valores de ICH en el grupo testigo utilizado en este estudio, encontramos valores comparables a los reportados por otros autores, (resumidos por Gebhart en 1981,) - (16). Nuestros resultados en el grupo de los pacientes tratados muestran un incremento total de 1.75% sobre el grupo testigo, sin embargo, consideramos que este incremento es azaroso y no muestra significancia estadística. Estos resultados coinciden con los reportados por Hunke y Carpenter, 1978 (25), pero difieren de los obtenidos por Habedank y col. 1982 (20), quienes reportan en un grupo de 9 pacientes valores de 0.2181 ICH/cromosoma y 10.03 ICH/metafase, mientras que en el grupo de 9 testigos los valores fueron de 0.1411 ICH/cromosoma y 6.49 ICH/matafase, lo que representa un aumento sobre el valor basal. Los niveles séricos de DFH reportados en estos pacientes fueron de 40 a 80 u mol/L, valores similares a los obtenidos en nuestros pacientes (36 a 86.6 u mol/L). No encontramos ningún parámetro de su metodología que difiera de la utilizada en el presente estudio y que pudiera explicar las diferencias en los resultados obtenidos. Cabe señalar que en un estudio "in vitro" (Hunke y Carpenter, 1978 (25)), con dosis superiores de DFH a las utilizadas en los pacientes, encontraron -- que la DFH es inductora de ICH, llamando la atención las diferencias entre los resultados obtenidos "in vivo" y los obtenidos "in vitro"; si estas diferencias se deben a la dosis, sería interesante evaluar los ICH en pacientes intoxicados que muestren concentraciones séricas elevadas de DFH.

Aberraciones cromosómicas

Los valores basales de aberraciones cromosómicas en individuos sanos reportados por diversos autores (Amerose y Schuster --- 1971, Grosse 1972, Ayne 1976, y Goh 1973.) (14), van de 5.1 a 7.8%. El valor promedio obtenido en los individuos controles evaluados - en el presente estudio fué de 3.37% valor que es comparable a los mencionados en la literatura.

El porcentaje de aberraciones cromosómicas encontrado en -- los pacientes en tratamiento con DFH fué de $\bar{x} = 8.1\%$, este aumento no es estadísticamente significativo. Estos resultados coinciden - con Bartch 1975 (4),: quien no encuentra un incremento en el por--centaje de aberraciones cromosómicas en niños epilépticos tratados con DFH, en cultivo de linfocitos. Otros autores como Alving 1977- (2), Knwtilas y col 1977 (28), Stenchever y Allen 1978 (58) y Eber y col 1981 (14) coinciden con los resultados anteriores.

Se ha considerado que los resultados negativos pudieron de-berse a que los linfocitos fueron cultivados 72 Hrs y las células- se dividieron 2 ó 3 veces, por lo tanto pudieron haberse eliminado selectivamente las células dañadas, explicandose así el hecho de -- que Herha y Obe en 1976 (23), encontraran diferencias significati--vas en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en 14 epilépti--cos con monoterapia. Un estudio posterior de estos mismos autores- mostró una disminución en la frecuencia de aberraciones cromosómi- cas. Los datos obtenidos en esta investigación, descartan la posi- bilidad de que haya una selección de las células dañadas, ya que - en estos cultivos a pesar de haber sido hechos a 72 Hrs, la presen- cia de 5 Brdu permitió identificar células en primera división.

Eber y col en 1981 (14) discute que sus datos negativos a - diferencia de los de Obe y Herha se deben posiblemente a que él es- tudió niños y que posiblemente éstos tengan un mecanismo de repara- ción de ADN más eficiente que los adultos, tienen menor tiempo de- tratamiento y las dosis que se les administran a los niños son mu-

cho más pequeñas. Sin embargo en nuestro estudio la mayoría fueron adultos y no se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia de aberraciones cromosómicas en un niño estudiado, comparándolo -- con los adultos, tampoco se encontraron diferencias en cuanto al - sexo, los valores en las mujeres fueron 7.5% de A.C., los cuales - fueron similares a los encontrados en los hombres (8.9%).

Marquez-Monter y col en 1970 (40) reporta un aumento en la frecuencia de endoreduplicaciones y células hipodiploides, pero - estas no se consideran como aberraciones cromosómicas. Nosotros no encontramos dichas alteraciones con una frecuencia elevada.

Cabe señalar que las divergencias encontradas en la literatura pudieron deberse al hecho de que los estudios realizados, com paran grupos de individuos controles con grupos de individuos tratados, lo que descarta el factor individual, de hecho Mitelman y - Hartley-Asp 1980 (44) reportaron un efecto mutagénico del metronidazol, al evaluar individuos tratados comparandolos con individuos- controles, sin embargo al evaluar a los pacientes antes y después del tratamiento, no encontró dicho efecto mutagénico. Estos hechos ilustran la importancia que tiene el evaluar al paciente antes y - después del tratamiento.

Esta observación adquiere especial importancia en el caso - de la DFH, ya que esta droga es una de las tres únicas que se ha - reportado estratogénica y carcinigénica, por lo cual es importante poder demostrar su mutagenicidad, ya que se ha reportado que los - puntos capaces de causar rompimientos cromosómicos y mutaciones gé nicas en algún sistema biológico, tienden a causar cáncer y defectos en el nacimiento.

En nuestros pacientes ciertos individuos mostraron una fre-- cuencia elevada de aberraciones cromosómicas, a pesar de que una - vez evaluadas estas diferencias no fueron significativas, será necesario evaluar a los pacientes antes de comenzar el tratamiento, - para poder descartar la variabilidad individual.

Es importante, por lo tanto, evaluar si los individuos que muestran un incremento en el porcentaje de aberraciones cromosómicas pudieran ser los individuos que tienen hijos con defectos genéticos o desarrollan ciertos tipos de cáncer, mediante estudios longitudinales de los pacientes antes y durante el tratamiento, que abarque estos tres aspectos.

VI BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alving, J., Krogh, J.M. & Meyer, H. (1976). "Diphenylhydantoin - and chromosome morphology in man and in rat. A negative report." Mutation Research 40:173-176.
- 2.- Alving, J., Krogh, J.M. & Meyer, H. (1977). "Chromosome studies - of bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes from diphenylhydantoin treated patients". Mutation Research. 48:361-366.
- 3.- Anderson, Y. (1982). "Genetics basis of the epilepsy". p.p. - 1-122. Raven Press.
- 4.- Bartch, H.D. (1975). "Cytogenetics testing of antiepileptics - drugs in human patients". Mutation Research 20:279 -284.
- 5.- Bimboes, D. & Greim, H. (1976). "Human lymphocytes as target -- cells in a metabolizing test system "in vitro" from detecting potential mutagens". Mutation Research -- 35:155-160.
- 6.- Bishum, N.P. (1975). "Chromosomes and anticonvulsant drugs". - Mutation Research 28:141-143.
- 7.- Borofskys, L.G., Louis, S. & Henn, K. (1973). "Diphenylhydantoin in children". Neurology 23:967-972.
- 8.- Brogger, A. (1970). "Anticonvulsant drugs and chromosomes". -- Lancet. november. p.p. 979.
- 9.- Carrano, V.A., Mikler, J.L., Stekta, D.G. & Moore, D.H. (1980). - "Variations in the baseline frequency in human lymphocytes". Inverom. Mutag. 2:325-337.

- 10.- Cortinas, N.C. y Ostrosky, W.P. (1980). "Mutágenos y carcinógenos químicos ambientales". Inst. Inv. Biomed. UNAM Vol. 1 p.p. 1-146.
- 11.- Demaco, H.J. & Lawless, L.M. (1983). "Variability of phenytoin protein binding in epileptic patients". Arch Neurol Vol. 40:481-483.
- 12.- Donnadieu, R.F. (1981). "Epilepsia". Camelice p.p. 1-57. Méx.
- 13.- Donohoe, D. (1979). "Puntos básicos en la epilepsia infantil" Propaganda Geigy p.p. 1-19. Méx. D.F.
- 14.- Eber, K.J., Kotlarek, F. Habedank, M & Mulher, J. (1981). "Chromosomal investigations in children long term therapy with phenytoin or primidone". Human. Genet. 56:345-348.
- 15.- Escobedo, R.F. Rubio, D.F. y Otero, E. (1973). "Epidemiología de la epilepsia". Gaceta médica de México Vol. 105-No. 2 p.p. 155-165.
- 15.- Ferguson, M.J. & Gaulde, M.E. (1983). "Effects of bromodeoxyuridine and gamma radiation on blast cell formation and mitosis in human peripheral blood lymphocytes. Examination on donor variation." Envirom. Mutag. Society Program and Abstracts. San Antonio, Texas.
- 16.- Gebhart, E. (1981). "Sister Chromatid Exchange and structural-aberration in mutagenicity testing". Human. Genet.-58:235-254.
- 17.- Glaser, H.G. (1979). "Diphenylhydantoin Toxicity". Tomado de "Anticonvulsant Drugs". Henn Kut. Chapter 20 p.p. -219-226.

- 18.- Guilotto,T., Mottura,A., Giorgi,R.C. & Nuzzo,F. (1980). "Frequency of sister chromatid exchange in relation to cell kinetics in lymphocytes culture. Mutation Research. 70:374-350.
- 19.- Goodman,L.S. & Gilman,A. (1970). "The pharmacological basis - of therapeutics". 4th Edition p.p. 207-212.
- 20.- Habedank,M., Eber,J, Brull,D. & Stumpf,C. (1982). "Increased-sister chromatid exchange in epileptics children during long term therapy with phenytoin." Human. Genet 61:71-72.
- 21.- Hanson,J.W. & Smith,D.W. (1975). "The fetal hydantoin syndrome". Journal Pediatrics. 87:285.
- 22.- Heijbel,J. (1975). "Benign epilepsy of childhood with centro temporal EEG foci, a genetics study". Epilepsia 16: 285-293.
- 23.- Herha,J. & Obe,G. (1976). "Chromosomal damage in epileptics - on monotherapy with carbamazepine and dyphenylhidantoin". Human Genetics. 34:255-263.
- 24.- Hitzing,B.G. (1980). "Gufa educativa sobre la epilepsia". Division de salud mental. p.p. 1-31. Bogota Colombia.
- 25.- Hunke,M.H. & Carpenter,J. (1978). "Effects of dyphenylhidantoin on the frequency of SCE in human lymphocytes". Am. J. Human. Gnet. 30:1 abstract 83A.
- 26.- Joseph,W. (1975). "Congenital malformations". Year book medical publisher. Ohio p.p. 1-98.

- 27.- Jusko, J.W. (1976). "Bioavailability and disposition kinetics of phenytoin in man". Quantitative studies in epilepsy. Raven. Press. p.p. 115-324.
- 28.- Knwtilas, S., Siimes, M., Simell, O. Tamisto, P. & Weber, T. --- (1977). "Long term of phenytoin, effects on bone marrow chromosome in man". Mutation. Research. 43:309-312.
- 29.- Kopeloff, Y. (1960). "Experimental epilepsy in the mouse". -- Proc. Soc. Exp. Biol. 104:500-504.
- 30.- Kowalczyk, J. (1980). "Sister chromatid exchange in children treated with nalidixic acid". Mutation Research 77: 371-375.
- 31.- Kutt, H. & Penry, K. (1974). "Usefulness of blood levels of anti-epileptics drugs". Arch. Neurol. Vol. 31:289-294
- 32.- Kutt, H. (1979). "Mechanism of action of anti-epileptics drugs" Chapter 34 p.p. 621-663. Cornell University.
- 33.- Lambie, D.G., Nanda, R.N. & Jonshon, R.H. (1976). "Therapeutics- and pharmacokinetics effects of increasing phenytoin in chronic epileptics on multiple drug therapy". -- Lancet. August 21:386-389.
- 34.- Latt, A.S., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A. & Falke, E. (1981). "Sister chromatid exchange. A report of genotox program". Mutation Research 87:17-62.
- 35.- Lennox, W.G. (1960). "The genetics of epilepsy". In Churchill- J. and Eds. Epilepsy and related disorders J. and - Churchill p.p. 532-574.

- 36.- Lerner,A.R. & Dixon,J.F. (1973). "The human lymphocyte as an experimental animal". Scientific Amer. Vol. 28 No 6 p.p. 82-91.
- 37.- Lewin,P.K. (1973). " Phenytoin associated congenital defects with Y chromosome variant. Lancet March p.p. 559.
- 38.- Lund,L. (1974). " Anticonvulsant effects of diphenylhydantoin relative to plasma levels". Arch.Neurol. Vol. 31:289-294.
- 39.- Marcus,A.K. & Milton,J.Ch. (1978). "Current medical diagnosis and treatment". Lange Medical publications 1th edition p.p. 572-577.
- 40.- Marquez-Monter, Ruiz-Fragoso y Velasco,E. (1970). " Anticonvulsant drugs and chromosome". Lancet August p.p. 980. Méx. D.F.
- 41.- Massino,L. (1974). "Hematological and citogenetic effects induced in the newborn by anticonvulsant treatment of the mother during pregnancy". Gaslini 6/2: 166-174. Italy.
- 42.- Metrakos,F. & Metrakos,L. (1972). "Genetics factors in the epilepsy". A work Shop MINDS. Monograph p.p. 96-102.
- 43.- Metzelf,L.M. (1979). " Folate antagonism following teratogenic exposure to DFH". Teratology 19:45-50.
- 44.- Mitelman,F. & Hartley-Asp,B. (1980). " No citogenetics effects of metronidazole". The Lancet, June 7, p.p. 1249- - 1250.

- 45.- Moorhead,P.S., Nowell,P.C. & Mellamn,W.J. (1960). "Chromosome-preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood". Experimental cell research. May. vol 20:613-619.
- 46.- Morgan,F.W. & Crossen,R. (1981). " Factors influencing SCE rate in cultured human lymphocytes". Mutation Research.- 81:395-402.
- 47.- Mutchinik,O., Lisker,R. y Ruz,L. (1978). "Intercambio de cromátidas hermanas". Gaceta médica de México vol. 114 - No 12 Diciembre, p.p. 579-584.. Méx.
- 48.- Nicholas,H.A., Vienne,M. & Vanden,B.H. (1979). "Induction of-sister chromatid exchange and frequency in cultured human lymphocytes". Mutation Research. 63: 345-349.
- 49.- Newmark,H. & Penry,G. (1980). "Genetics of epilepsy". p.p. 1-122. Raven Press.
- 50.- Painter,B.R. (1982). "Replication model for sister chromatid-exchange". Alan. R. Liss. Inc. p.p. 115-120.
- 51.- Paulson,W.G. & Paulson,R.B. (1981). "Teratogenics effects of-anticonvulsant". Arch Neurol. 38: 140-143.
- 52.- Rubio,D.F. (1971). "Metabolismo de los anticonvulsivos". Rev. Inst. Nac. Neurol. Vol. V No 4 p.p.36-40.
- 53.- Rubio,D.F. (1980). "Historia natural de la epilepsia". Rev.- Fac. Med. Méx. p.p. 4-33. Méx.
- 54.- Rubio,D.F. (1981). "Epilepsia". Propaganda Tegretol, GEIGY. - p.p. 1-57.

- 55.- Saez,A.F. (1978). "Citogenetica básica y biología de los cromosomas". PRONADISE p.p. 20-177. Montevideo Uruguay
- 56.- Sakari,K., Siimes,M. Smiell,O. & Tammismto,P. (1977). "Long -- term use of phenytoin: effects on bone marrow chromosomes in man". Mutation research. 43:309-312.
- 57.- Snope,AJ. & Rary,J. (1979). "Cell cycle duration and sister -- chromatid exchange frequency in cultured human lym phocytes". Mutation Research. 63:345-349.
- 58.- Stenchever,M.A. & Allen,M. (1978). "The effect of selected antiepileptic drugs on the chromosomes of human lym phocytes, "in vitro"". Am J. Obstetr. Gynecol. Vol. 116 No 6 p.p. 867-870.
- 59.- Warkany,J. (1975). " Congenital malformations". Year Book Me dical Press. p.p. 98-99.
- 60.- Wolff, S.(1977). "Sister chromatid exchange". Ann. Rev. Genet 11:183-201.
- 61.- Wolff,S. (1982). " Sister chromatid exchange". Willey Inter-- since Publications. p.p. 1-306 New York U.S.A.
- 62.- Woodbury,J.K. (1978). " Antiepileptics drugs". Raven Press.- p.p. 113-123; 219-226. New York U.S.A.