



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Evaluación del efecto genotóxico de la
fenitoína sódica en eritrocitos de sangre
periférica de ratón (*Mus musculus*) cepa CD-1
y análisis del efecto teratogénico en la F1**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta

Norberto Alarcón Herrera

Director de Tesis

Dr. Saúl Flores Maya



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UBIPRO, Laboratorio de Recursos Naturales) la cual se convirtió en mi segunda casa.

Al Dr. Saúl Flores Maya

Mi asesor de Tesis, al cual le guardo un gran afecto, a quien además admiro y estimo. Muchas gracias por ofrecerme todo su apoyo, por aconsejarme y corregirme cuando era necesario pero sobre todo gracias por brindarme su amistad. Gracias por confiar en mí.

A la Dr. Martha Martínez García

Revisora y sinodal de la Tesis, por todos sus consejos y palabras. Por brindarme su tiempo y motivarme para seguir adelante. Muchas gracias.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra y la M. en C. Maru Eugenia Heres y Pulido, por todo el apoyo brindado, el cual que me ha permitido crecer como biólogo y persona.

Al proyecto PAPCA número 39 él cual financió este proyecto y permitió que se lograron los objetivos de dicho trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre MARÍA ELENA HERRERA: Gracias por darme la vida, por haber estado al pendiente de mí en cada paso que he dado, por todo tu amor que no tengo como agradecer. Gracias por ser la mejor mamá y papá del mundo, mostrándome tú fortaleza en cada uno de los obstáculos que se nos han presentado. Gracias haberme dado el mejor ejemplo del mundo: nunca rendirme, ser honesto, fuerte y valiente. Soy quien soy por ti. Te amo mamá.

A YESENIA ANDREA: Gracias por ser y formar parte de mi vida tanto en lo bueno como en lo malo, por hacer de mí una mejor persona día con día. Por escucharme, alentarme, apóyame, etc., por ser cómplice de todas mis locuras. Te amo, gracias por haber confiado en mí, prometo no defraudarte.

A LUZ ELENA SOL, mi china: Hermanita este es un triunfo de los dos, espero llegar a ser un ejemplo para ti, quiero que seas mucho mejor que yo. Siempre contarás conmigo. Gracias por haber llegado a mi vida en el momento exacto. Te quiero negrita.

A mi FAMILIA: Nene y Martita, por ser mis mamás y darme su amor. Papá Lupitos gracias por cuidarme y brindarme tu cariño. A Paola por todo el apoyo que me ha brindado, somos hermanos. A mi prima Rosita que me cuidaba de chiquito. A todas las nenas de la casa. A todos mis tíos y tías que me han brindado su confianza. Los quiero mucho a todos este logro es gracias a ustedes.

Gracias a todos...

Contenido

RESUMEN.....	5
Abstract	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Marco Teórico	8
Mutagénesis	8
Pruebas para detección de genotoxicidad	11
Eritropoyesis	15
Metabolismo xenobiótico	19
Epilepsia	21
Teratogénesis	25
Antecedentes	27
Planteamiento del problema	27
Hipótesis	27
Objetivo General	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	31
Toxicidad	31
Conteo de células blancas (Citotoxicidad)	33
Genotoxicidad	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

RESUMEN

Las convulsiones son uno de los desórdenes neuronales más comunes, pudiendo ser desde crisis esporádicas hasta ataques recurrentes (epilepsia). Para el caso de las personas epilépticas, éstas 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 no hay información 100% clara sobre sus efectos genotóxicos. Por ello, en este trabajo se evaluaron los posibles efectos genotóxicos de la fenitoína mediante el ensayo de micronúcleos en ratones *Mus musculus* cepa CD-1 expuestos durante 30 días. Los tres tratamientos de fenitoína (2.8, 4.2 y 6.64 mg/Kg) indujeron clastogénesis en los cromosomas de ratón cepa CD-1, determinando que a mayor concentración mayor es el daño. Además, se indujo daño citotóxico inhibiendo la proliferación celular de eritrocitos con las dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg.

Palabras clave: epilepsia, clastogénesis, fenitoína, toxicidad, micronúcleos.

Abstract

Convulsions 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 life, being a major phenytoin prescription for convulsions control medicines out. However, despite having several decades in the market there isn't information 100% clear about their genotoxic effects. Therefore this study had the objective 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 3 doses of phenytoin used (2.8, 4.2 and 6.64 mg/Kg) induced clastogenesis in the mouse chromosomes, determining that at higher concentration the greater damage. Furthermore, also they induce cytotoxic damage inhibiting the erythrocyte cell proliferation with doses of 4.2 and 6.64 mg/kg.

Keywords: epilepsy, clastogenesis, phenytoin, toxicity, micronucleus.

INTRODUCCIÓN

Las convulsiones o ataques epilépticos son una de las crisis neurológicas más comunes que pueden presentarse desde la infancia hasta la vejez, viéndose en estudios epidemiológicos que alrededor del 1% de la población mundial la padece. Para México se considera una frecuencia de 10 a 20 personas por cada 1000 (López *et al.*, 2009). Las causas de estas crisis pueden ser variadas, desde eventos aislados y agudos (no asociados con la epilepsia) hasta eventos recurrentes (asociados a epilepsia). El término epilepsia suele utilizarse solo cuando la persona presenta un desorden cerebral crónico caracterizado por convulsiones recurrentes (Asociación Española de Pediatría-Sociedad Española de Urgencias Pediátricas 2010).

Las personas que sufren crisis recurrentes, deben estar bajo tratamiento médico. Medicamentos como el fenobarbital, la carbamazepina y la oxcarbazepina son usados para el control de los ataques convulsivos. Sin embargo, la fenitoína 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 y, a pesar que se conocen sus posibles efectos secundarios neurotóxicos, no están claros sus posibles efectos genotóxicos. (Fernández *et al.*, 2007). La dosis recomendada es de 4 mg/Kg/día aunque es recomendable que se haga un seguimiento de la dosis pues hay personas que con 2.6 mg/Kg les es eficiente, mientras que otros pacientes, deben incluso aumentar la dosis a 5.3 mg/Kg (Rang y Dale, 2012).

Por otro lado, es requisito obligatorio que por cada medicamento, vacuna, etc., que hayan sido desarrollados, se realice la evaluación genotóxica y, aunque para la década de los 90 no existía un consenso internacional sobre el tipo y la cantidad de pruebas sobre genotoxicidad que debían llevarse a cabo, ya estaban bien asentados los criterios para catalogar a un xenobiótico como genotóxico (Hayashi *et al.* 2000). Actualmente la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) han establecido la batería de pruebas que deben realizarse para evaluar la genotoxicidad de algún alimento, droga, etc. Dicha batería de pruebas consta de: A) Pruebas de dosis agudas a

corto plazo como la prueba de Ames; 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) las Dosis subcrónicas y C) las pruebas de dosis crónicas, utilizan las mismas pruebas toxicológicas que los estudios a corto plazo pero varían el tiempo de exposición. 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 (MN) *in vivo* sobre eritrocitos de sangre periférica en ratones ha sido ampliamente utilizado para detectar agentes clastogénicos (rompimiento de cromosomas) y aneuploidógenos (que afectan el huso mitótico alterando el número cromosómico) mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosómicos que se rezagan en la mitosis, los cuales quedan fuera del núcleo y forman dichos MN (Flores *et al.*, 2013).

Los ensayos de MN, tienen gran importancia debido a que se pueden realizar simultáneamente con un estudio general toxicológico, permiten la obtención de resultados de una forma relativamente rápida (Hayashi *et al.*, 2001).

En un principio, el ensayo de MN fue desarrollado en eritrocitos de médula ósea de ratón, posteriormente con algunas modificaciones se pudo aplicar en diversas especies y tejidos (hígado, células germinales y tejidos fetales o neonatales). La presencia de MN en eritrocitos de sangre periférica en cualquier especie, depende principalmente del grado de eficacia del sistema retículo endotelial (en especial el bazo) el cual cumple con la función de eliminar los eritrocitos viejos y/o anómalos. Por tanto, si la especie tiene mayor eficiencia de eliminación, reduce la posibilidad de observar eritrocitos micronucleados independientemente de si el organismo está siendo afectado por un agente genotóxico (MacGregor *et al.*, 1990).

Marco Teórico

Mutagénesis

Desde que se originó la vida, los factores ambientales han permitido la diversificación y al igual que todos los organismos, los humanos también nos vemos expuestos a agentes físicos, químicos e inclusive biológicos (Cuenca y Ramírez, 2004). Estudios epidemiológicos demuestran cómo algunos compuestos capaces de provocar alteraciones al DNA, es decir, son capaces de generar alteraciones genéticas (mutaciones), se relacionan con la carcinogénesis y teratogénesis (Smith, 1992).

Estas alteraciones son la fuente primaria de variación genética y por ende se vuelven indispensables para llevar a cabo el proceso evolutivo, demostrando que las mutaciones pueden ser benéficas para las especies, o bien ser neutrales. Sin embargo, no todas las mutaciones actúan de esta forma (en determinado tiempo y hábitat) para el desarrollo de una especie. Por lo que los estudios de mutagénesis son importantes para evaluar los posibles riesgos de carcinogenicidad y teratogenicidad como consecuencia de la exposición a agentes genotóxicos (Wexler, 2014).

El término mutación se refiere a aquellos cambios en el material genético que sean heredables. Dichas mutaciones no son siempre detectables inmediatamente, por ejemplo, si son mutaciones recesivas en heterocigosis. Si la mutación aparece en las células germinales, esta mutación será transmitida a las siguientes generaciones. En los adultos pueden llegar a presentarse mutaciones en aquellos tejidos con alto recambio (alta frecuencia mitosis) como por ejemplo: médula ósea, intestinos, piel y bronquios. En muchas ocasiones las mutaciones somáticas pueden originar la transformación de células normales a células tumorales, especialmente si se afectan oncogenes, genes supresores de tumores y de reparación del DNA (Luca y Seoane, 2008).

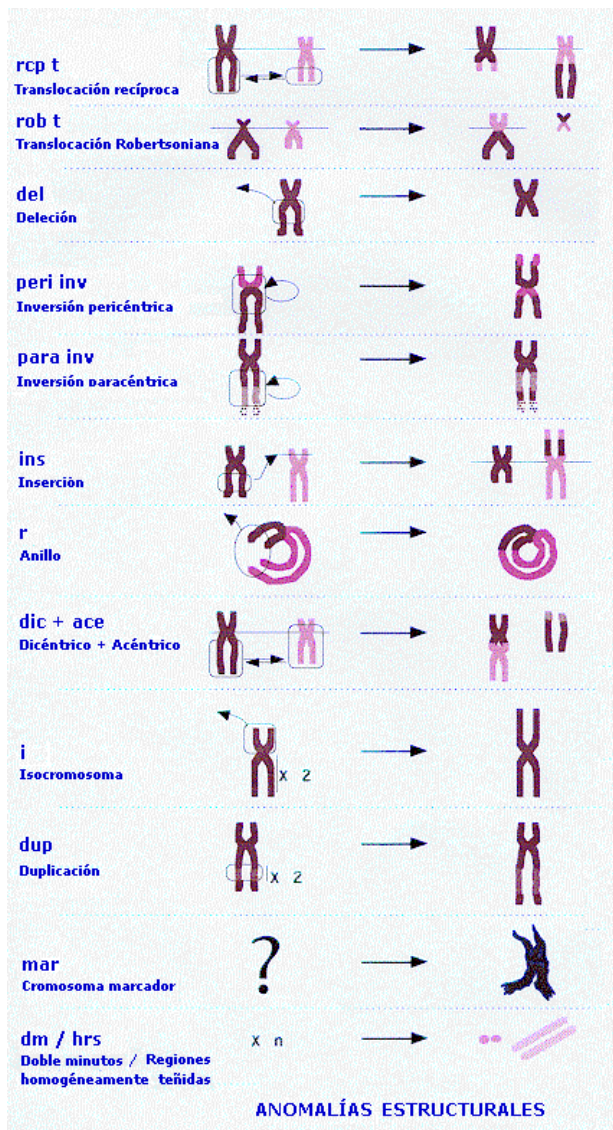
Las mutaciones se clasifican en dos tipos: 1) mutaciones puntuales, que se basan en la modificación de un par de nucleótidos, y 2) las alteraciones cromosómicas: modificaciones que generan alteraciones cromosomales que involucran de varios

a miles de millones de nucleótidos. Estas últimas alteraciones pueden ser de dos tipos: alteraciones numéricas y estructurales. Las alteraciones numéricas pueden originarse por el resultado de un fenómeno denominado no disyunción o no separación cromosómica (se presenta cuando uno de los cromosomas, junto con su homólogo, pasan al mismo polo o se incorporan a la misma célula), por un rezago anafásico en la migración de los cromosomas hacia los polos celulares (estos dos fenómenos pueden originarse en alguna de las dos divisiones meióticas, o presentarse en la división mitótica) y por el cambio en el número de cromosomas, lo que implica la repetición de varios sets o conjuntos haploides de cromosomas (Maloy y Hughes, 2013).

Si los cambios generados en los cromosomas llevan a la presencia de un número que es múltiplo exacto del número haploide, se denomina euploidia, pero cuando sólo uno o algunos cromosomas se ven involucrados, a la alteración se le llama aneuploidía. Las aneuploidías en gametos o embriones son más conocidas por su relación con el origen de malformaciones congénitas en el nacimiento, como las trisomías en recién nacidos, cuando hay un cromosoma adicional como es el caso del Síndrome de Down (21, 47, XY o XX,+21), las monosomías que se dan por la falta de un cromosoma como en el Síndrome de Turner (45X), las dobles trisomías, que es cuando se encuentran dos cromosomas adicionales de distinto par como en personas con tres cromosomas X y Síndrome de Down (48XXX,+21) y las tetrasomías o presencia de dos cromosomas adicionales del mismo par como en el Síndrome de Klinefelter (48XXXY). Si la no separación cromosómica se genera en una etapa temprana de la mitosis, después de la formación del cigoto (falla postcigótica), durante la formación de las primeras blastómeras, se originan los mosaicos o mixoploidías, donde el organismo tendrá dos o más líneas celulares siendo una normal y la otra u otras se encontrarán afectadas en su número cromosómico. Es importante señalar que no todas las líneas celulares que se forman son viables, ya que algunas pueden llegar a quedar sin la información genética necesaria para seguir multiplicándose y desaparecen (Salamanca, 1988).

Las alteraciones estructurales son provocadas por agentes clastogénicos (tanto de naturaleza física como química o biológica), los cuales provocan la fractura o rompimiento del cromosoma. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de reparar el daño, pero puede que llegue a ser tan grave que los mecanismos no sean eficientes y se produzcan dichas alteraciones (Velasco, 2011).

Dentro de las alteraciones intracromosómicas se encuentran las deleciones, inversiones, anillos, etc. Las deleciones se dan cuando un segmento del cromosoma se pierde, éstas pueden ser terminales o intercalares; si la deleción



ocurre en los dos extremos del cromosoma, la porción que porta el centrómero y sus extremos rotos y forma una estructura circular o cromosoma en anillo. Las inversiones se generan cuando un segmento cromosómico rota 180° sobre sí mismo y se coloca nuevamente en el cromosoma, y por ende la secuencia de genes queda alterada. La inversión puede ser paracéntrica, si el segmento que se invirtió no incluye el centrómero, o pericéntrica si el centrómero queda incluido (Figura 1) Por otro lado las dentro de las aberraciones intracromosómicas se tienen las translocaciones simples, recíprocas y robertsoniana (Luca y Seoane, 2008).

Fig. 1. Esquema con aberraciones cromosómicas estructurales (Atlas Genetics Oncology, 2014).

En todo el ciclo celular, las mutaciones se presentan con mayor incidencia durante la etapa G1 por ser la etapa con mayor duración durante todo el ciclo, aunque el período S parece ser la etapa más sensible para que ocurran mutaciones puntuales (Velasco, 2011).

Pruebas para detección de genotoxicidad

El efecto mutagénico puede evaluarse por medio de diferentes medios. Las técnicas preferentemente usadas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Southern Blot (SB), Northern Blot (NB), Western Blot (WB), corrimiento electroforético en gel de agarosa (PAGE) e inmunodetección (Plant, 2003).

Dentro del área de la genética toxicológica existen muchas pruebas de genotoxicidad, como lo son:

- Ensayo o Test de Ames, que puede detectar daño por sustitución, adición y deleción de algunos pares de bases de DNA en bacterias como *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Escherichia coli* (*E. coli*) (FDA, 2007).
- Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en cultivo de células de mamíferos detectando aberraciones cromosómicas.
- Prueba SMART en *Drosophila melanogaster*, que permite detectar mutaciones y recombinaciones somáticas.
- Ensayo de MN en eritrocitos de ratón, para evaluar efectos clastogénicos y aneuploidogénicos (FDA, 2007)

Pruebas in vivo. Prueba de micronúcleos

La presencia de MN en cualquier estirpe celular indica una pérdida de material genético, ya que los MN son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal formados por la clastogénesis de cromosomas acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico (Figura 2), lo que conlleva a la aparición de un pequeño núcleo en algunas células anucleadas como los eritrocitos o bien en el citoplasma de células nucleadas como linfocitos o espermatogonias (Mavournin *et al.*, 1990).

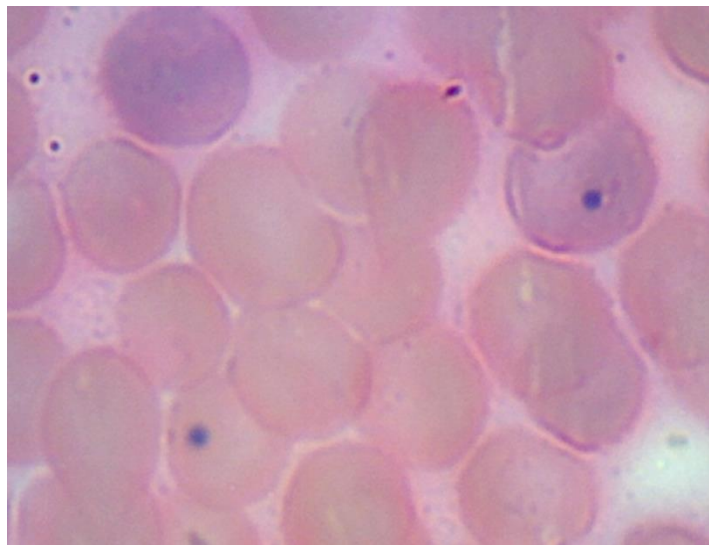


Fig. 2. Micronúcleos inducidos por cicloheximida en sangre periférica de ratón (Foto tomada por Norberto Alarcón Herrera, 2013)

La técnica se basa en el siguiente principio: en células en anafase, los fragmentos de cromosomas que no posean centrómero o se hayan inactivado, no podrán integrarse a un núcleo por carecer del carácter primario para orientarse en el huso mitótico. Eventos parecidos ocurren cuando el huso mitótico está dañado o hay un rezago anafásico (Figura 3). Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero, dan origen al núcleo en células

hijas, mientras que los elementos rezagados quedan inmersos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en núcleos secundarios, que por regla serán más pequeños que el núcleo principal, y de ahí el nombre de MN (Schmid, 1975).

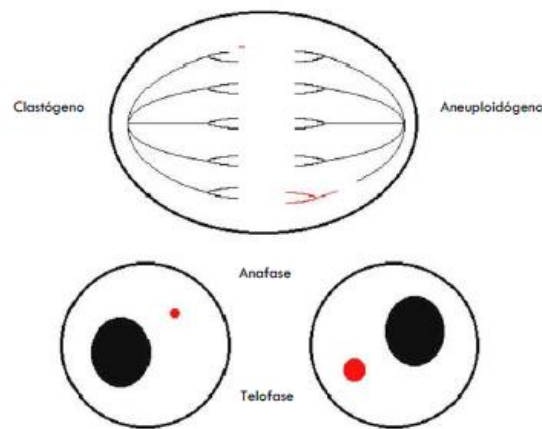


Fig. 3. Mecanismos de formación de los micronúcleos (Velasco, 2011).

La existencia de micronúcleos ha sido reconocida desde hace muchos años y se asocia con daño cromosómico desde los primeros trabajos con radiación. En 1959 fueron utilizados por primera vez como indicadores de daño citogenético por Evans y *col.*, quienes utilizaron el ensayo de inducción de MN para cuantificar el daño citogenético causado por los rayos gamma y neutrones en presencia y ausencia de oxígeno (*cit in* MacGregor *et al.*, 1990).

Hacia la década de los 60 Schmid y colaboradores; así como Hededle en los 70 realizaron estudios para determinar qué parámetros considerar en la evaluación de la genotoxicidad en médula ósea *in vivo*. Concluyeron que la presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) es un buen indicador de daño y lograron que se estableciera como una prueba para evaluar el daño citogenético (Figura. 4) (Schmid, 1975).

Algunas ventajas que posee esta prueba son las siguientes: no es necesario conocer el cariotipo del modelo biológico, además, el ensayo es fácil y de rápido manejo. Además, la prueba de MN se puede realizar en una gran variedad de

especies (humano, ratón, rata, etc.) así como de tejidos (eritrocitos, células germinales, cultivo de linfocitos de sangre periférica, células de la mucosa bucal, entre otros) ya que la condición esencial es que el tejido esté en constante proliferación (Hayashi, *et al.*, 2001).

En 1993, Hayashi y *col.*, propusieron la sangre periférica como tejido para realizar ensayos de MN pues aporta muchas ventajas al estudio: permite ver una curva de tiempo-respuesta, evaluar los sistemas de reparación del organismo, así como poder realizar estudios crónicos e inclusive llevarlos a siguientes generaciones (Hayashi *et al.*, 2000).

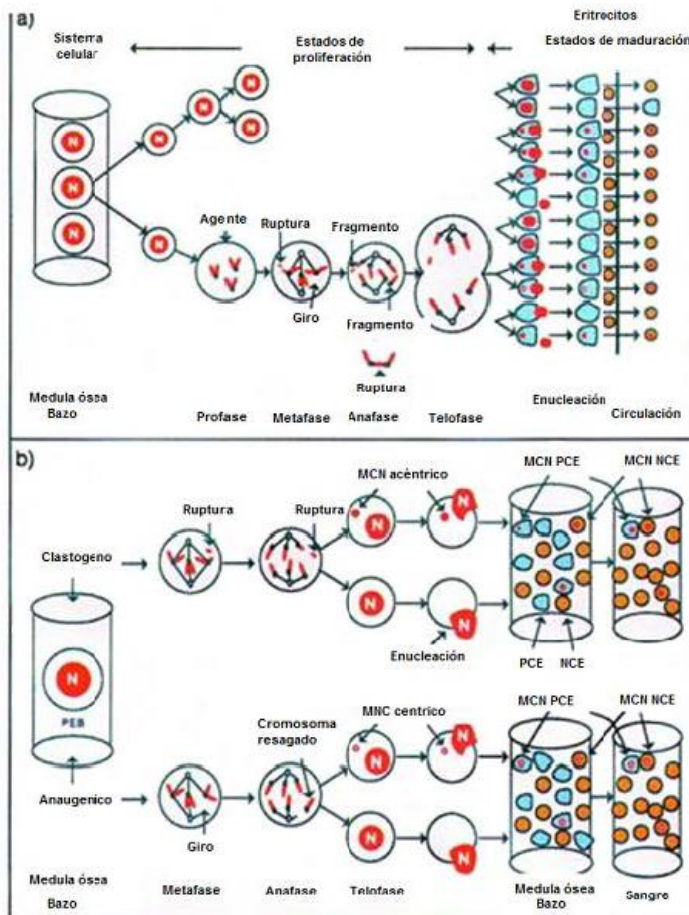


Fig. 4. Mecanismos de formación de micronúcleos inducidos por agentes clastogénicos (Krishna y Hayashi, 2000).

Prueba de micronúcleos en ratón.

Sin importar cuál sea el modelo biológico para realizar este ensayo es importante conocer aspectos esenciales como su ciclo eritropoyético, así como saber las condiciones de su sistema retículo endotelial. Para el ratón, MacGregor y *col.*, en 1990, señalan que el tiempo de vida de un eritrocito es aproximadamente de 30 días y se considera que el ciclo celular dura entre 12 y 20 horas, el tiempo que ocurre desde la división hasta la enucleación es alrededor de 6 horas, mientras que el tiempo de los eritrocitos policromáticos (EP) en la médula ósea es de 24 horas. Esto es importante considerarlo para la elaboración de diseños experimentales, ya sea si son tratamientos agudos, crónicos o subcrónicos. En el caso de estudios crónicos o subcrónicos se recomienda también analizar eritrocitos normocromáticos (MacGregor *et al.*, 1990).

Eritropoyesis

En humanos el eritrocito, hematíe o glóbulo rojo es una célula anucleada (no tiene núcleo) transportadora de hemoglobina (Hb), que es necesaria para incrementar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Se considera que ciertas influencias micro ambientales inducen a la célula madre hematopoyética pluripotencial para convertirse en la progenie eritroide diferenciada.

Diferentes sistemas de cultivo han demostrado que los progenitores eritroides tienen diferente potencial proliferativo. Los progenitores eritroides más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E por sus siglas en inglés), las cuales mantienen una alta tasa de proliferación en respuesta a citocinas (IL-3) y a la eritropoyetina. Estas células darán origen a los progenitores eritroides maduros, denominados Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU por sus siglas en inglés), dichas células tiene un potencial proliferativo limitado, aunque para su división no es indispensable la eritropoyetina (Mayani *et al.*, 2007).

Las CFU darán origen a los pronormoblastos o proeritoblastos, que son las primeras células morfológicamente diferenciables. Aumentan dos veces su tamaño

(20-25µm), contienen un gran núcleo de cromatina laxa, con uno o dos nucléolos evidentes. Tienen citoplasma basófilo ya que presentan polirribosomas, además de vesículas de clatrina. El proeritoblasto tiene 4-8 divisiones mitóticas y da lugar a dos normoblastos basófilos o eritroblastos basófilos. Estas células presentan un tamaño menor (18-20 µm), un núcleo redondo de tamaño menor, con cromatina laxa y condensada. Siguen mostrando dos nucléolos, además del citoplasma basófilo, pero menos intensificado, frecuentemente tiene un halo pálido alrededor del núcleo (Henry, 1993).

Después de la mitosis del normoblasto basófilo se da lugar a una policromasia en la célula debido a la producción de Hb, por lo que a las células hijas se les denomina normoblastos policromáticos o eritroblastos policromatófilos. Son células más pequeñas (15-18 µm) con un núcleo de cromatina condensado donde no se pueden observar los nucléolos. Presentan un citoplasma con mezcla de colores basófilos y eosinófilos. Son las primeras células que ya han sintetizado Hb y que aún presentan polirribosomas. Por medio de dos divisiones mitóticas dan lugar al eritoblasto normocromático el cual mide entre 12-15 µm, con el núcleo más pequeño, redondo y excéntrico. El eritoblasto normocromático se desglosa: mediante movimientos ondulantes el núcleo es expulsado y es fagocitado por el siderocito, mientras que el resto de la célula recibe el nombre de reticulocito (Figura 5) (Velasco, 2011).

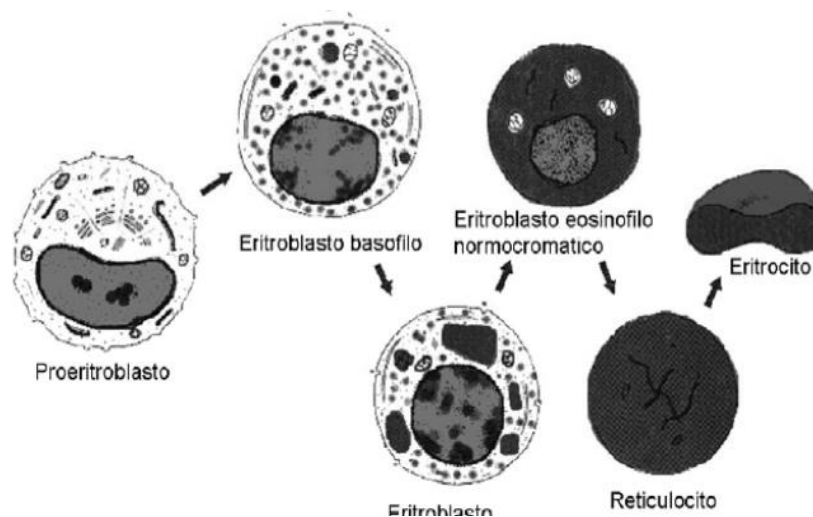


Fig. 5. Esquemas sobre las diferentes etapas de maduración celular en la eritropoyesis (Mayani *et al.*, 2007).

El reticulocito mide entre 9 y 10 μm y es anucleado. En ellos aún se sintetiza Hb por lo que presentan una coloración policromática, ya que además contienen ribosomas residuales, mitocondrias y otros orgánulos que son eliminados hasta la maduración eritrocitaria. Pueden salir a la circulación (1%) a terminar su proceso de diferenciación en un periodo de 24 a 48 h. Si se quedan en la médula ósea terminarían allí su maduración y originarán el eritrocito de unas 7.5 μm de diámetro (Mayani *et al.* 2007).

En el humano, los eritrocitos permanecen 120 días en circulación, disminuyen su funcionalidad y finalmente son destruidos por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial o monocito-macrófago (Rodak, 2005).

En roedores adultos, los órganos hematopoyéticos son la médula ósea y el bazo, los cuales contienen las células principales de la eritropoyesis en estado de proliferación y maduración. Durante la proliferación las células continuarán dividiéndose, si en este momento se administra algún xenobiótico éste puede actuar y causar daño cromosómico, generando clastogénesis, translocaciones, o puede interactuar con macromoléculas relacionadas con la función de disyunción de la cromátida. Durante la maduración del eritroblasto pueden llegar a generarse eritrocitos policromáticos donde el núcleo principal ha sido expulsado y cualquier micronúcleo formado puede llegar a permanecer en alguna parte del citoplasma. Con la maduración del reticulocito perderá RNA y contendrá primordialmente Hb, convirtiéndose en un eritrocito normocromático (Krishna y Hayashi, 2000).

Eritrocitos policromáticos

El evaluar la presencia de MN en eritrocitos policromáticos se debe a que son células jóvenes (reticulocitos) que han sido recientemente liberadas a la circulación, que aún contienen RNA, así como parte del aparato ribosómico lo cual nos permite identificarlas claramente por medio de tinción y a que se puede detectar de forma muy fácil la presencia de MN debido a que son células anucleadas. Los eritrocitos policromáticos presentan una coloración mezclada

entre basófila y eosinófila que cambiará dependiendo el estado de madurez de las células. Generalmente son de un tamaño mayor que los eritrocitos normocromáticos y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de la hemoglobinización total del protoplasma (Hayashi *et al.*, 2000). El aumento en su proporción con respecto a los valores estándar indica una eritropoyesis aumentada, y de forma contraria si hay un descenso en su valor es indicativo de una inhibición en la proliferación celular (MacGregor *et al.*, 1990).

El número de eritrocitos policromáticos en circulación generalmente suele ser muy bajo, en humanos representa del 2-4%, sin embargo cuando existe un aumento considerable se pueden llegar a tener alteraciones como casos de anemia graves, eritropoyesis aumentada por pérdida celular causada por hemorragias. En el ensayo de MN el aumento o descenso en los valores estándar puede deberse al efecto citotóxico del xenobiótico (Velasco, 2011).

La eritropoyetina (EPO) actúa como una de las principales citocinas reguladoras de la eritropoyesis. La principal función de la EPO es controlar la producción de las células eritroides a través de la promoción de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea. Es importante destacar que además de EPO, citocinas como Interleucina 3 (IL-3), la tromboyetina (TPO), el ligando de tirosina fetal 3 (FLT-3L) y el factor de células seminales (SCF) participan también en la eritropoyesis; estas citocinas son capaces de sinergizar la diferenciación celular con la EPO (Mayani *et al.*, 2007).

Inclusiones eritrocitarias

En algunas ocasiones los eritrocitos pueden llegar a presentar cuerpos de inclusión, que se hacen visibles al ser teñidos con Giemsa, Wright o Hematoxilina denominados Corpúsculos de Howell-Jolly (éste es el nombre que se le da a los MN en hematología). Dichos cuerpos son remanentes nucleares compuestos por cromatina, que aparecen como inclusiones esféricas y excéntricas de tamaño de 1 a 2 μm (Krishna y Hayashi, 2000).

Sistema retículo endotelial: papel del bazo

El sistema retículo endotelial (Figura 6) tiene la función de eliminar a los eritrocitos viejos y a los que presenten alteraciones (incluidos los MN), ya que filtra la sangre y los elimina mediante células fagocíticas (Bañales, 2009).

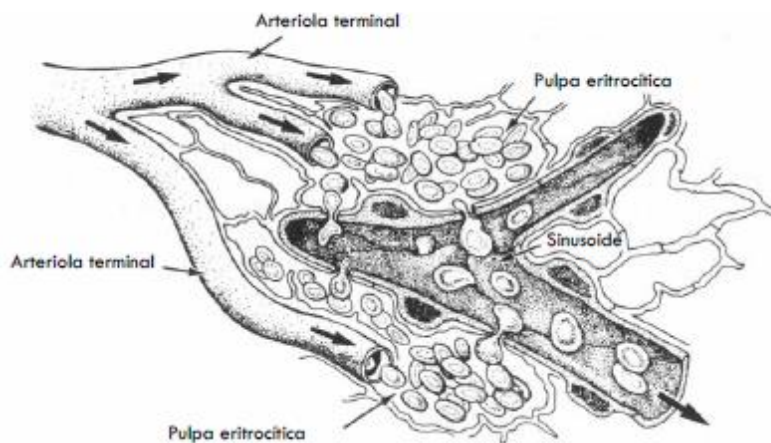


Fig. 6. Esquema del funcionamiento del bazo (Bañales, 2009).

Existen especies que tienen sistema retículo endotelial con alta eficiencia para eliminar a los eritrocitos anormales. Esto dificulta la posibilidad de observar eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica. El sistema retículo endotelial puede ver afectada su actividad en relación con la madurez que tenga el organismo (Zúñiga *et al.*, 2001).

Metabolismo xenobiótico

El término xenobiótico hace referencia a cualquier compuesto extraño al organismo, el cual ingresa por medio de diferentes vías y es capaz de provocar alteraciones en diferentes rutas metabólicas, ya sea de forma inmediata, a mediano o largo plazo (Coutiño, 2011).

Normalmente la mayoría de los xenobióticos, una vez absorbidos se distribuyen sistémicamente hasta llegar a los órganos encargados de su biotransformación.

Dicho proceso consiste en una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas, cuyo resultado es la formación de productos no tóxicos o de baja toxicidad celular y que además sean de fácil excreción (Vázquez *et al.*, 2014).

Las reacciones de biotransformación se clasifican en: a) Fase I o no sintéticas, que incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis y B) Fase II, sintéticas o de conjugación. Los sistemas enzimáticos que intervienen en las reacciones de Fase I se encuentran en el retículo endoplásmico liso, mientras que las enzimas que intervienen en las reacciones de Fase II en su mayoría se encuentran en el citoplasma. Las reacciones de Fase I involucran la exposición o introducción de grupos químicos funcionales amino (-NH₂), hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) o sulfhidrilo (-SH), que generalmente terminan inactivando a los xenobióticos, aunque en algunos casos el nuevo metabolito puede actuar como mutágeno. Muchas de estas reacciones tienen lugar bajo la catálisis de enzimas de los sistemas llamados oxidasas de función mixta (OFM). Es importante destacar la participación de los Citocromos P450 en las reacciones de oxidación; todos los metabolitos originados de estas reacciones son productos más polares que el compuesto original (Gallego, 2009).

Las reacciones de Fase II o de conjugación se realizan con la participación de un metabolito endógeno (ácido glucurónico, grupos sulfatos, acetilo o glutatión), el cual se combina con los productos de las reacciones de Fase I mediante enzimas específicas llamadas transferasas. Los productos obtenidos de la Fase II son compuestos altamente hidrosolubles, lo que permite que sean eliminados con facilidad por la orina y las heces en metazoarios (Plant, 2003).

Epilepsia

De forma clásica se define como crisis epiléptica o convulsiva, a aquellos signos y síntomas derivados por la activación excesiva e hipersincrónica de las neuronas del córtex cerebral. De forma clínica suele presentarse de diversas formas, desde alteraciones de conciencia hasta alteraciones motoras, autonómicas, sensitivas, sensoriales o psíquicas (López *et al.*, 2009).

Se consideran crisis epilépticas sintomáticas o agudas a aquéllas que se producen en estrecha relación temporal con una afección sintomática o cerebral. Es decir, que se generan durante la primera semana después de haber sufrido un *ictus*, un traumatismo craneoencefálico, una cirugía intracerebral o anoxia cerebral. Otros factores que pueden llegar a desencadenar una crisis convulsiva sintomática son la presencia de trastornos metabólicos graves, la intoxicación o privación de alcohol o por administración de alguna droga o fármaco (Beigi *et al.*, 2010).

Se nombra a un persona epiléptica cuando ha sufrido una crisis convulsiva única no provocada o sin relación temporal con algún estímulo conocido de carácter recurrente. La clasificación de crisis epilépticas del año 2010 según la *International League Against Epilepsy* (ILAE), son solo sugerencias y no están globalmente aceptadas. Sin embargo, en ella se clasifican a las crisis epilépticas como: crisis generalizadas (tónico-clónicas, de ausencia y mioclonías), crisis focales y desconocidas (Falip y Codina, 2011).

Definición Fisiopatológica

Desde el punto de vista fisiopatológico la epilepsia se define como una alteración repentina de la función del sistema nervioso central (SNC), como consecuencia de una descarga eléctrica de alto voltaje, provocada por un desequilibrio entre los mecanismos excitatorios e inhibitorios en el cerebro (Schmidt y Wilder, 1968).

Dentro de las múltiples causas responsables del aumento en la excitabilidad neuronal, una de ellas está representada por cambios en las concentraciones de neurotransmisores excitatorios (el glutamato, la acetilcolina, la serotonina) y/o

inhibitorios (el ácido gamma amino butírico (GABA) o la glicina). Se ha evidenciado un aumento en la liberación de glutamato en el cerebro en crisis focales, además se ha descrito que alteraciones en los sistemas inhibitorios, mediados principalmente por GABA, tienen una relación estrecha en la generalización de las convulsiones (Schousboe, 1991).

Epidemiología

Estudios epidemiológicos indican que 1 % de la población mundial padece epilepsia y se considera que entre 1 y 3% de la población tendrá epilepsia durante su vida (López *et al*, 2009). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2001 existían 37 millones de personas en el mundo con epilepsia idiopática y 50 millones con epilepsia sintomática, de las cuales 80% vivían en países subdesarrollados de Asia, África y América del Sur. Siendo la tasa global de personas con epilepsia de 8.2 casos por cada 1000 personas. Siguiendo los protocolos establecidos por la ILAE, se ha podido establecer que en países desarrollados la tasa es de 50 casos por cada 100,000 habitantes. En países subdesarrollados la incidencia se vuelve mayor oscilando entre 100-190 casos de epilepsia por cada 100,000 y, que para el caso específico de México, la prevalencia de pacientes epilépticos es de 10-20 casos por cada 1000 (Figura 7) (Falip y Codina, 2011).



Fig. 7. Prevalencia de la Epilepsia en América Latina (x1000) (Pérez *et al.*, 2002).

Algunos factores que influyen tanto en la incidencia como la prevalencia de la epilepsia son: la edad, el sexo, la zona de residencia, el nivel socioeconómico y la etiología de la epilepsia, entre otros (Falip y Codina, 2011).

Tratamientos

Durante un tiempo se llegó a creer en la existencia de un fármaco que fuera efectivo para tratar todo tipo de epilepsias, pero, la gran variabilidad en la etiología de la enfermedad ha provocado que se generen una gran cantidad de fármacos los cuales suelen tener una mayor eficacia para controlar determinado tipo de crisis epiléptica. Existen fármacos anticonvulsivos que controlan adecuadamente la enfermedad en aproximadamente dos tercios de los pacientes y una fracción de pacientes epilépticos son resistentes a todos los medicamentos disponibles (Katzung, 2005).

Fármacos

Hacia finales de la década de los noventa se disponía aproximadamente de 16 anticonvulsivos, tanto de primera y segunda generación, de los cuales, 13 de ellos pueden clasificarse en cinco grupos químicos muy similares: barbitúricos, hidantoínas, oxazolidinedionas, succinimidias y acetilureas. Estos grupos tienen en común una estructura de anillo heterocíclico similar, con diversos sustituyentes. Muy pequeños cambios en la estructura pueden alterar significativamente el mecanismo de acción y las propiedades clínicas del fármaco (Bowman, 1990).

Fenitoína

La fenitoína (Figura 9) es el fármaco anticonvulsivo no sedante más antiguo, el cual también suele estar indicado en Cardiología como antiarrítmico del grupo Ib (lidocaína). Químicamente es una diamida cíclica sustituida. (Kiec-Kononowicz *et al.*, 2002)

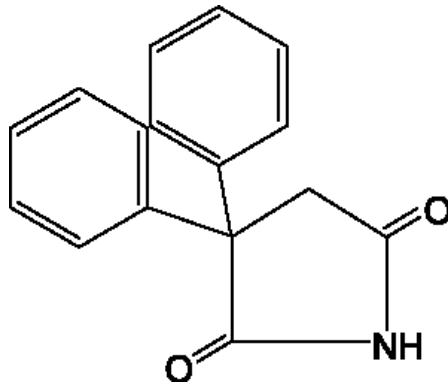


Fig. 9. Estructura química de la Fenitoína (Katzung, 2005).

Su mecanismo de acción es la inhibición de los canales de sodio, bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Afectando más a las neuronas normales que propagan las descargas que a las del foco epiléptico. Además, reduce la liberación de ácido glutámico, lo que puede deberse a la inhibición de los canales de sodio presinápticos o al bloqueo de canales de calcio N y P/Q que inhiben la liberación de neurotransmisores (Katzung, 2005).

Farmacocinética

La absorción oral de la fenitoína es completa pero lenta, por lo que en situaciones especiales se administra por vía intravenosa, mientras que por vía intramuscular su absorción puede ser impredecible. La fenitoína se fija a proteínas plasmáticas (albúmina) en un 90% y su concentración en el líquido cefalorraquídeo y saliva corresponde al 10 %. Se elimina casi totalmente por hidroxilación en el hepatocito a través del CYP2C9 y CYP2C19. Dicha eliminación depende de la dosis ya que su metabolismo puede llegar a saturarse con dosis elevadas, siguiendo una cinética dependiente de Michaelis-Menten (Rang y Dale, 2012). La fenitoína induce la expresión de los citocromos CYP2C y CYP3A, la glucoronidación y la epóxido hidroxilación, produciendo un gran número de interacciones clínicamente relevantes que pueden reducir la eficacia de otros medicamentos (Katzung, 2005).

Aplicaciones terapéuticas

La fenitoína sigue siendo usada ampliamente en el tratamiento para ataques convulsivos y crisis parciales epilépticas en adultos. El tratamiento puede empezarse con una dosis estándar de 300 mg o de 4.5-10 mg/Kg cada 24 h, aunque la gran variabilidad individual en su metabolismo y la existencia de una cinética no lineal saturable hacen muy difícil ajustar la dosis. Hay pacientes que con dosis de 2.5 mg/Kg/día responden correctamente al tratamiento, hay otros que requieren un aumento en la dosis de hasta 10 mg/Kg cada 24 h (Rang y Dale, 2012).

Teratogénesis

Se define como teratogénesis o dismorfogénesis a la alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo. Se calcula que la prevalencia de malformaciones mayores reconocidas en el nacimiento es de 3% y que otro 3% de malformaciones no son reconocidas durante el período neonatal. Este 6% no incluye retraso mental o físico o malformaciones menores como hidrocele, hernias, etc. (Gurnee, 2001).

Las malformaciones no pueden ser atribuidas al uso de fármacos en su totalidad. La causa de casi 40% de los casos es de origen desconocido. De un 12 a un 25% son por causas de defectos genéticos. Otro 20% son debido a las interacciones entre factores hereditarios y ambientales y de un 5 a un 9% a factores ambientales como única causa. Las malformaciones congénitas debidas estrictamente a factores ambientales son de 0.1 al 0.2 % de todos los nacidos vivos y solamente una pequeña porción de éstas son debidas a fármacos que actúan como teratógenos (Rubio y García, 1993).

La exposición a medicamentos durante el embarazo es elevada. Entre el 44.2 y 99.5% de las mujeres embarazadas toman algún medicamento durante la gestación. Además, se debe considerar que la edad en la que actualmente se da la gestación es mayor, lo cual hace que aumente el número de mujeres que han

estado sometidas a tratamientos crónicos por enfermedades diagnosticadas antes del embarazo. También hay que tomar en cuenta que los cambios fisiológicos propios de la gestación, pueden afectar parámetros farmacocinéticos de los fármacos afectando su eficacia y toxicidad, tanto para la madre como para el feto. Los medicamentos pueden afectar al feto durante cualquier periodo del embarazo, aunque está determinado que existe un mayor riesgo durante el primer trimestre ya que en esta fase tiene lugar la formación de la mayoría de los órganos (Pérez *et al.*, 2002).

En mujeres epilépticas el riesgo de presentar complicaciones durante su embarazo es mayor, pudiendo ocasionar que la descendencia presente efectos adversos. No obstante, alrededor de un 90% de las mujeres epilépticas tienen hijos sanos. Hay evidencia que señala cómo la exposición intrauterina a fármacos antiepilépticos incrementa el riesgo de malformaciones congénitas y dicho riesgo es mayor cuando la exposición es a más de un fármaco antiepiléptico. El riesgo de malformaciones congénitas también se ha atribuido a la propia epilepsia materna y a las convulsiones generadas durante el embarazo. En el caso de mujeres epilépticas las causas de la presencia de malformaciones podrían ser multifactoriales, pero es indudable que fármacos antiepilépticos son potencialmente teratógenos, sobre todo cuando se administran en politerapia y en dosis altas (Rebordosa y Aguilera, 2004).

Antecedentes

- Lealgarza *et al.*, en 1990, determinaron que la fenitoína sódica es genotóxica mediante intercambio de cromátidas hermanas en ratones machos y hembras cepa Balb-C, a partir de dosis de 10 mg/Kg, además encontraron que existe una relación directa entre la dosis administrada y el número de intercambios entre cromátidas hermanas.
- Kindig *et al.*, en el 1992, señalan que la fenitoína no es genotóxica en estudios a corto plazo, mediante estudio de aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino.
- Yüksel *et al.*, en 2010, catalogan a la fenitoína como genotóxica mediante la prueba SMART de *Drosophila melanogaster*, encontrando que a partir de concentraciones de 1.25 mg/mL se daba la recombinación, además reportan que sin importar la dosis disminuye la tasa de supervivencia.

Planteamiento del problema

En tratamientos semicrónicos ¿La fenitoína es genotóxica en eritrocitos de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*) Cepa CD-1 e induce teratogénesis en su F1?

Hipótesis

Si la fenitoína provoca clastogénesis y aneuploidía en eritrocitos de sangre periférica de ratones cepa Cd-1 y teratogénesis en la F1, entonces se observarán efectos a nivel cromosómico como la inducción de MN y malformaciones congénitas, respectivamente.

Objetivo General

- Evaluar el efecto genotóxico de la fenitoína sódica en eritrocitos de sangre periférica en ratones cepa CD-1 mediante ensayo de MN y su posible efecto teratógeno en las F1

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico.

Se usaron ratones machos y hembras de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad con un peso aproximado entre 25-30 g. Los ratones fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. 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) con cinco organismos (dos machos y tres hembras, seleccionados aleatoriamente) 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 al cual se aplicó en solo una ocasión 0.3 mL de cicloheximida por vía intraperitoneal con una dosis de 60 mg/Kg; 3) un lote experimental al cual se le administró vía intraperitoneal la fenitoína sódica con una dosis de 2.8 mg/Kg; 4) lote experimental al que 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. Cada ratón de los lotes experimentales recibió las dosis mencionadas cada 24 h durante 30 días dejando 2 días de reposo por cada 5 días de tratamiento. En el ensayo de dosis aguda (cicloheximida) donde el xenobiótico no actúa rápidamente y no presenta daño acumulativo, lo más recomendable es que sea administrado en una sola

dosis o bien en dos dosis cada 24 h, esto para asegurarse que el xenobiótico actúe durante el periodo de maduración celular.

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 (se elaboraron 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.

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones fueron contabilizadas auxiliándose de un microscopio óptico Nikon (100x) y posteriormente se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. Se observó un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de micronúcleos (MN) en células policromáticas (MNCP) por ratón y por día.

Conteo de células blancas.

Además, se realizó el conteo de 200 células blancas (linfocitos, segmentados, eosinófilos, basófilos y monocitos) por ratón para cada día de muestreo y así evaluar la respuesta inmune del organismo.

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: $\% \text{ MN} = \text{No. de MN en CP} / 2000 \text{ células totales} \times 100.$

Los datos fueron organizados en tablas. Por cada día de muestro se realizó ANOVA de un factor utilizando los datos individuales de cada lote experimental. Para los resultados globales se realizó ANOVA de un factor utilizando como datos individuales el promedio de cada lote experimental por día de muestreo. Además, en ambos casos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$). Todos los datos fueron calculados mediante el programa Minitab 16.

Teratogénesis.

A la par del estudio de genotoxicidad, se realizó la cruce de hembras con machos por método de aislamiento (2 machos-3 hembras). A las 24 h se realizó un lavado vaginal para corroborar la presencia de espermatozoides.

Se dejó nacer a los productos y se les mantuvo bajo revisión durante 30 días, para observar si se presentaban malformaciones, o algún otro trastorno, ya que a los 30 días se pueden considerar maduros. Los productos encontrados muertos, se pesaron, y observaron en microscopio estereoscópico para identificar posibles malformaciones congénitas externas e internas por medio de disección del animal.

RESULTADOS

Toxicidad

Se realizó el análisis estadístico por cada día de muestro (24, 48, 72, 192 h, 15 y 30 días) para evaluar el comportamiento tóxico de la fenitoína (Figura 10) De tal forma que los valores promedio señalaron lo siguiente:

Para las 24 h se obtuvo un valor de $F_{(obs)}=57.45 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$. Es decir, existen diferencias significativas con relación a la proporción de células policromáticas y normocromáticas. Mientras que la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que las tres dosis de fenitoína tienen dicha diferencia significativa.

A las 48 h el valor fue de $F_{(obs)}=134.82 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ señalando que existen diferencias significativas. De igual forma, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) demostró que las tres dosis poseen diferencias estadísticamente significativas.

Para las 72 h el valor calculado fue de $F_{(obs)}=4.42 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, lo cual denota que existe diferencia significativa entre las medias. Sin embargo, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) demostró que únicamente la dosis de 4.2 mg/Kg presentó diferencias significativas con respecto al control negativo.

Para las 192 h el valor obtenido fue $F_{(obs)}=10.22 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, demostrando que existen diferencias significativas entre las tres dosis y el testigo negativo, esto último corroborado por la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

Para el caso de los 15 días se obtuvo que $F_{(obs)}=3.16 < F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, indicando que no existen diferencias significativas. Sin embargo, la comparación múltiple de Dunnett demostró que al menos la dosis de 6.64 mg/Kg sí presenta diferencias significativas con respecto al testigo negativo.

Para los 30 días de obtuvo un valor de $F_{(obs)}=0.83 < F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, esto señala que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo, lo cual fue corroborado mediante la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

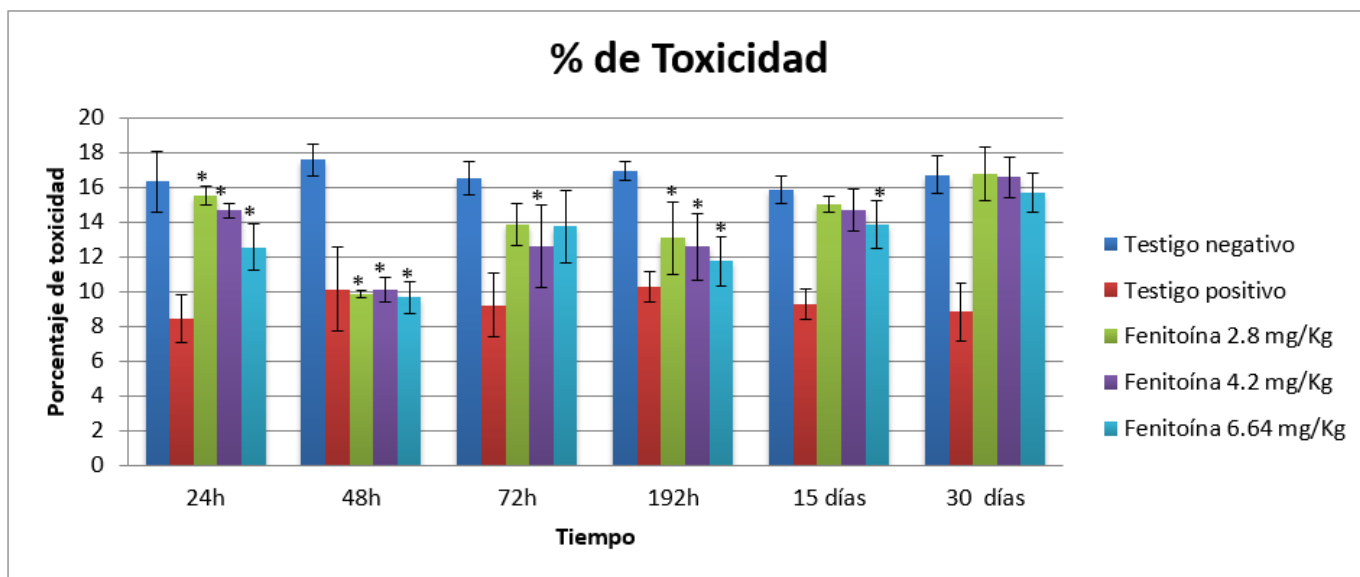


Fig. 10. Se observan los valores de toxicidad por cada día de muestreo. Desde las 24 hasta las 192 h, existen diferencias significativas en la proporción de células policromáticas y normocromáticas, en las tres dosis, a excepción de las 72 h, donde solo la dosis de 4.42 mg/Kg presentó dicha diferencia. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas corroboradas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

Finalmente se realizó un análisis estadístico contemplando todos los días de muestreo (24, 48, 72, 192h, 15 días y 30 días) para poder dar un resultado global. (Tabla 1). De este modo los valores promedio del efecto toxicológico evaluados de manera global mostraron un valor calculado (*obs*) de $F_{(obs)} = 4.22 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ (Figura 11). Es decir, los valores promedio de los tratamientos (dosis) presentan alguna diferencia significativa en relación a la proporción de células policromáticas y normocromáticas. 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 control negativo.

Morfológicamente, se observó irritación desde la espalda media hasta la nuca, en los ratones del testigo positivo así como en el tratamiento de Fenitoína de 6.64 mg/Kg, que se registró a partir de las 192 h de exposición y se mantuvo hasta los 15 días.

TABLA 1. Valores de toxicidad para cada tratamiento, evaluando la proporción de eritrocitos policromáticos y normocromáticos de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y **múltiple de Dunnett con el testigo negativo.

Tratamiento	Toxicidad (Media)	Des.Est
Testigo negativo	16.636	0.589
Testigo positivo	9.341**	0.729
Fenitoína 2.8 mg/Kg	14.021	2.412
Fenitoína 4.2 mg/Kg	13.526**	2.253
Fenitoína 6.64 mg/Kg	12.863**	2.074

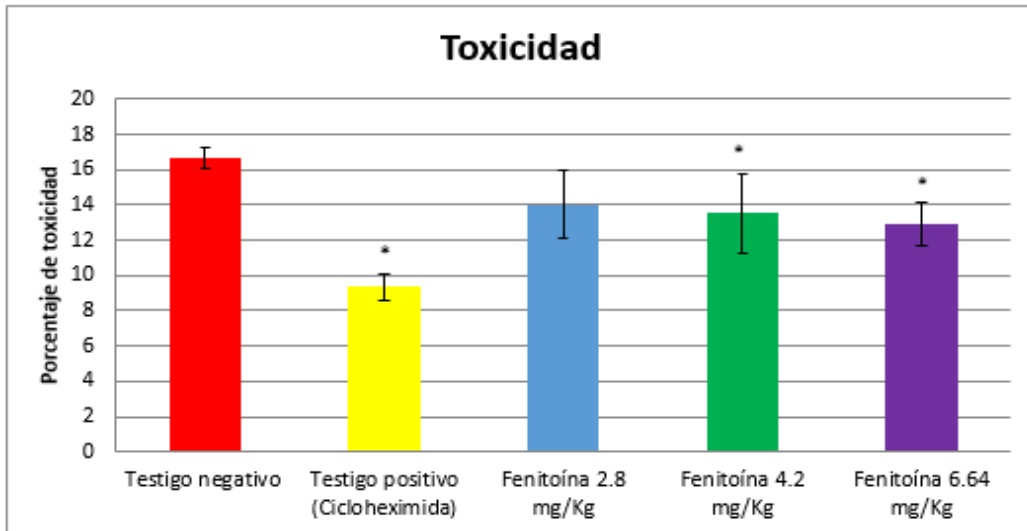


Fig. 11. Valor del % de toxicidad global a la exposición para cada tratamiento (dosis). Observando un decremento en el control positivo (cicloheximida) y a su vez un ligero decremento en las tres dosis de fenitoína. Solo el testigo positivo y las dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg fueron significativas.

Conteo de células blancas (Citotoxicidad)

De igual forma, se realizó ANOVA de un factor para cada estirpe celular por cada día de muestreo con el propósito de evaluar si existían diferencias significativas en las proporciones de leucocitos presentes en sangre periférica de ratón.

A las 24 h (Tabla 2), los basófilos con una de $F_{(obs)}=4.17 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ fueron la única estirpe celular en mostrar diferencia significativa con respecto al testigo negativo (Figura 12). Finalmente la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) señaló que solo los tratamientos de 4.2 y 6.64 mg/Kg fueron estadísticamente significativos.

TABLA 2. Conteo de células blancas para cada tratamiento a las 24 h, evaluando la proporción de leucocitos en un conteo de 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con el testigo negativo. Solo los basófilos expuestos a dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg fueron estadísticamente diferentes.

Leucocitos 24 horas	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	2.15			
Segmentados	2.59			
Eosinófilos	1.54			
Basófilos	**4.17		0.000	0.000
Monocitos	2.37			

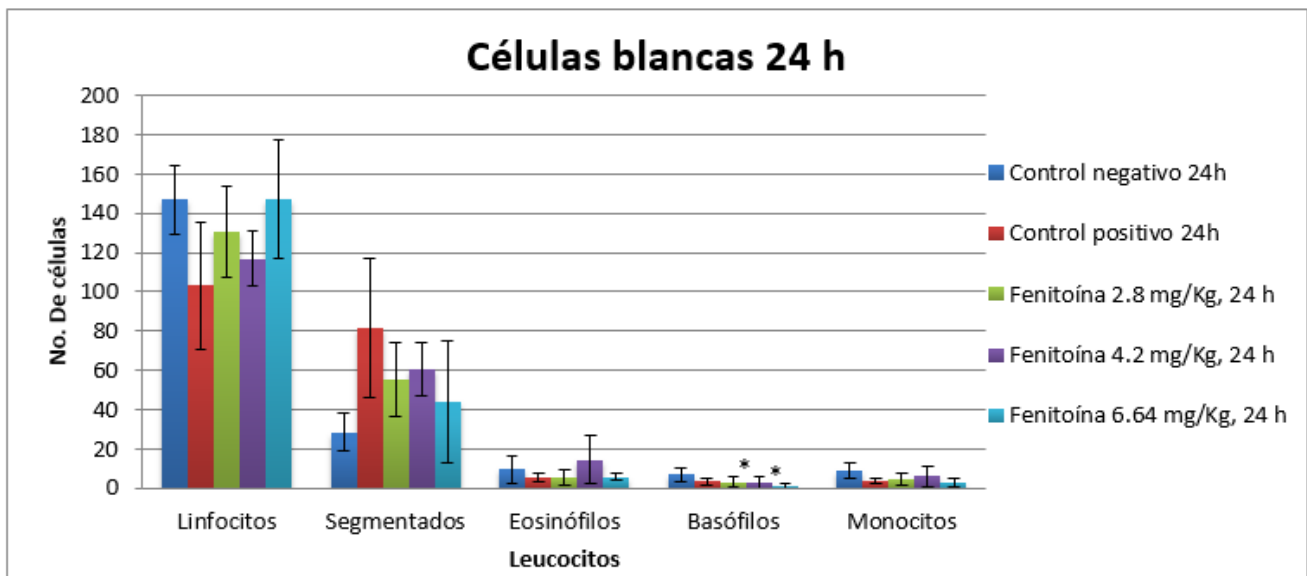


Fig. 12. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a las 24 h. * Solo los basófilos expuestos a dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg fueron estadísticamente diferentes.

Para las 48 h (Tabla 3), todas las $F_{(obs)}$ fueron menores a $F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, es decir, que los valores promedio de los tres tratamientos de todas las estirpes celulares no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo (Figura13).

TABLA 3. Conteo de células blancas para cada tratamiento a las 48 h, contemplando 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). Ningún tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas.

Leucocitos 48 horas	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	0.79	--	--	--
Segmentados	1.46	--	--	--
Eosinófilos	1.06	--	--	--
Basófilos	0.92	--	--	--
Monocitos	1.46	--	--	--

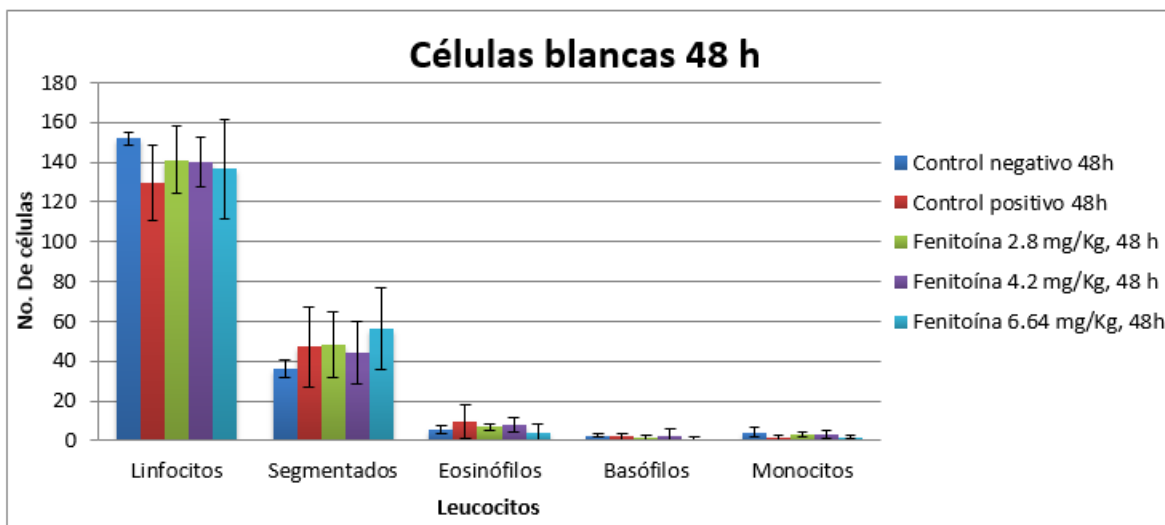


Fig. 13. Proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a las 48 h. Ningún tratamiento mostró diferencias estadísticamente relevantes con respecto al

El análisis estadístico a las 72 h (Tabla 4), mostró que los valores promedio tanto de linfocitos como de eosinófilos segmentados, con $F_{(obs)}=9.82 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$ y $F_{(obs)}=10.81 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$ respectivamente, presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo (Figura 14). Mediante la Comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se obtuvo que los tres tratamientos con fenitoína fueron significativos para ambas estirpes celulares.

TABLA 4. Conteo de células blancas para cada tratamiento a las 72 h, evaluando la proporción de leucocitos en un conteo de 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo. Los linfocitos y los eosinófilos segmentados mostraron diferencias estadísticamente significativas con las tres dosis.

Leucocitos 72 horas	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	9.82	0.001	0.001	0.001
Segmentados	10.81	0.000	0.000	0.000
Eosinófilos	1.27			
Basófilos	1.15			
Monocitos	4.31			

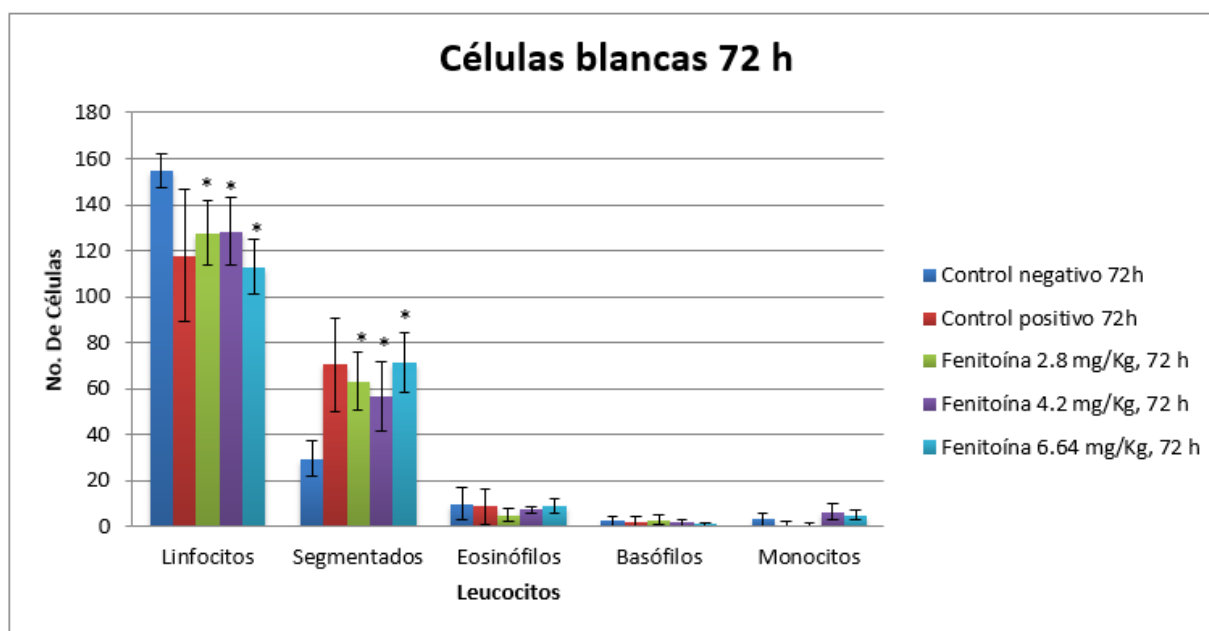


Fig. 14. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a las 72 h. * La proporción de linfocitos disminuyó en las tres concentraciones de fenitoína mientras que los segmentados aumentaron su proporción.

Para el caso de las 192 h (Tabla 5), el análisis estadístico señaló que tanto los linfocitos ($F_{(obs)}=7.09 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$) como los eosinófilos segmentados ($F_{(obs)}=5.81 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$) fueron significativamente diferentes con respecto al control negativo. Dicho resultado fue corroborado mediante la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicando que las tres dosis de fenitoína fueron estadísticamente diferentes (Figura 15).

TABLA 5. Conteo de leucocitos (%) en 200 células blancas de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*) para cada tratamiento a las 192 h. **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo. Nuevamente tanto los linfocitos como los eosinófilos segmentados mostraron diferencias estadísticamente significativas a las tres dosis.

Leucocitos 192 horas	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	7.09	0.003	0.003	0.003
Segmentados	5.81	0.007	0.007	0.007
Eosinófilos	1.16			
Basófilos	0.92			
Monocitos	2.28			

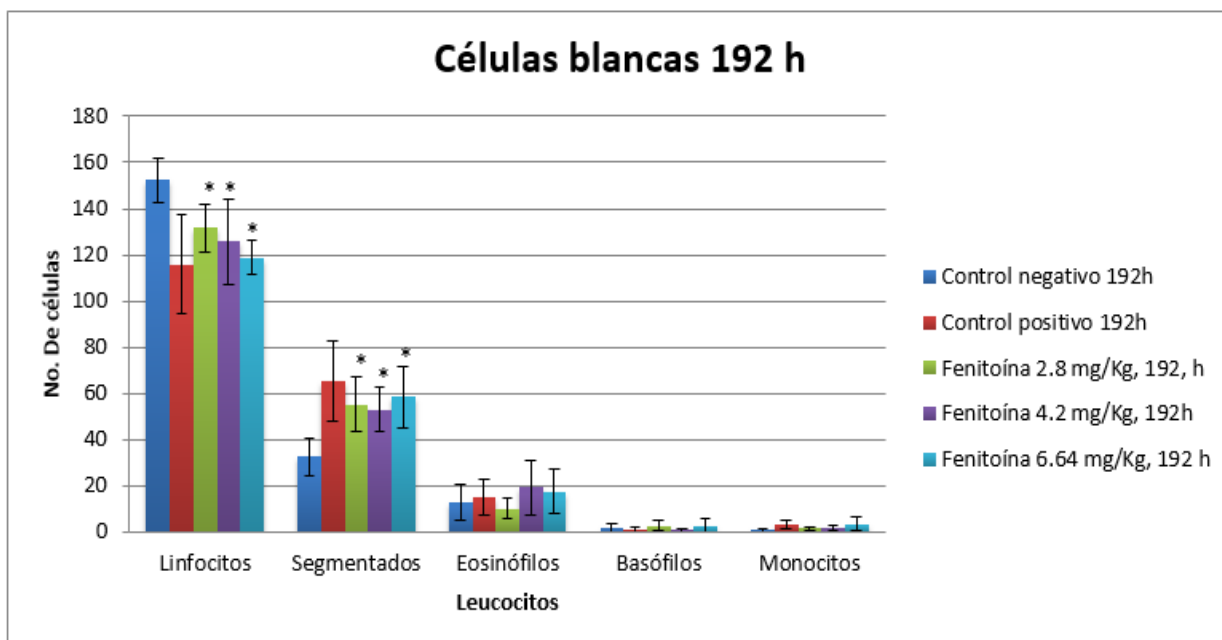


Fig. 15. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a las 192 h. * Nuevamente la proporción de linfocitos disminuyó en las tres concentraciones de fenitoína mientras que los segmentados aumentaron su proporción.

Para los 15 días (Tabla 6), nuevamente el análisis estadístico señaló que los linfocitos ($F_{(obs)}=6.35 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$) y los eosinófilos segmentados ($F_{(obs)} 5.11 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$) fueron los únicos tipos celulares en presentar diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo (Fig.16) Por otro parte, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que para ambos tipos celulares únicamente la dosis de 6.64 mg/kg fue la que presentó dicha diferencia significativa.

TABLA 6. Conteo de células blancas para cada tratamiento a los 15 días, evaluando la proporción de leucocitos en un conteo de 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo. Solamente los linfocitos y segmentados a dosis de 6.64 mg/Kg presentaron diferencias significativas.

Leucocitos 15 días	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	6.35			0.005
Segmentados	5.11			0.011
Eosinófilos	0.17			
Basófilos	0.85			
Monocitos	0.34			

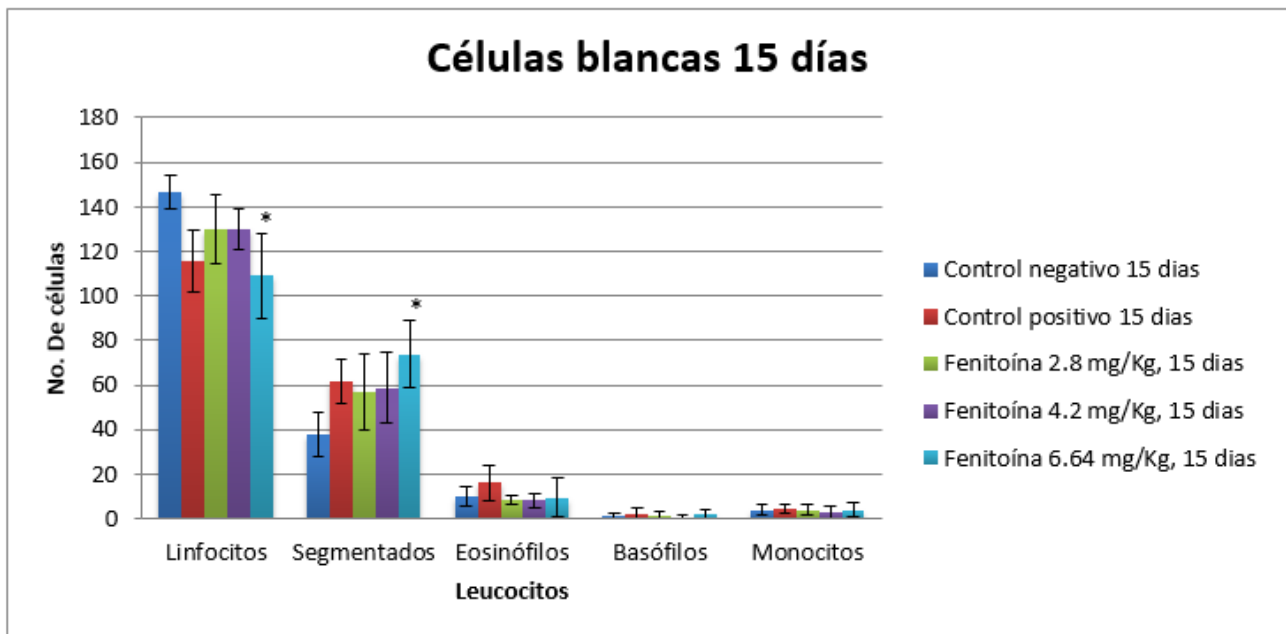


Fig. 16. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a los 15 días. * De igual forma los linfocitos disminuyeron su proporción y los segmentados la aumentaron, pero únicamente fue estadísticamente relevante con la dosis de 6.64 mg/Kg.

Para los 30 días el estadístico indicó diferencias significativas en 4 estirpes celulares (linfocitos, segmentados, eosinófilos y basófilos) como lo señala la Tabla 7. La comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) señala que para el caso de los linfocitos únicamente la dosis de 2.8 mg/Kg es estadísticamente significativa. De igual forma para los eosinófilos segmentados las dosis de 2.8 y 6.64 mg/kg son estadísticamente diferentes. Para el caso de eosinófilos las dosis que presentan diferencia significativa son las de 4.2 y 6.64 mg/Kg. Finalmente para el caso de basófilos, solo el tratamiento de 4.2 fue estadísticamente relevante (Figura 17).

TABLA 7. Conteo de células blancas para cada tratamiento a los 30 días, evaluando la proporción de leucocitos en un conteo de 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo. A los 30 días cuatro tipos celulares presentaron diferencias: los linfocitos solo con la dosis de 2.8 mg/Kg, los segmentados en dosis de 2.8 y 6.64 mg/Kg, los eosinófilos con las dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg y finalmente los basófilos en dosis de 4.2 mg/Kg.

Leucocitos 30 días	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/Kg	Fenitoína 4.2 mg/Kg	Fenitoína 6.64 mg/Kg
Linfocitos	3.51	0.040		
Segmentados	6.41	0.050		0.050
Eosinófilos	5.61		0.080	0.080
Basófilos	4.38		0.020	
Monocitos	0.81			

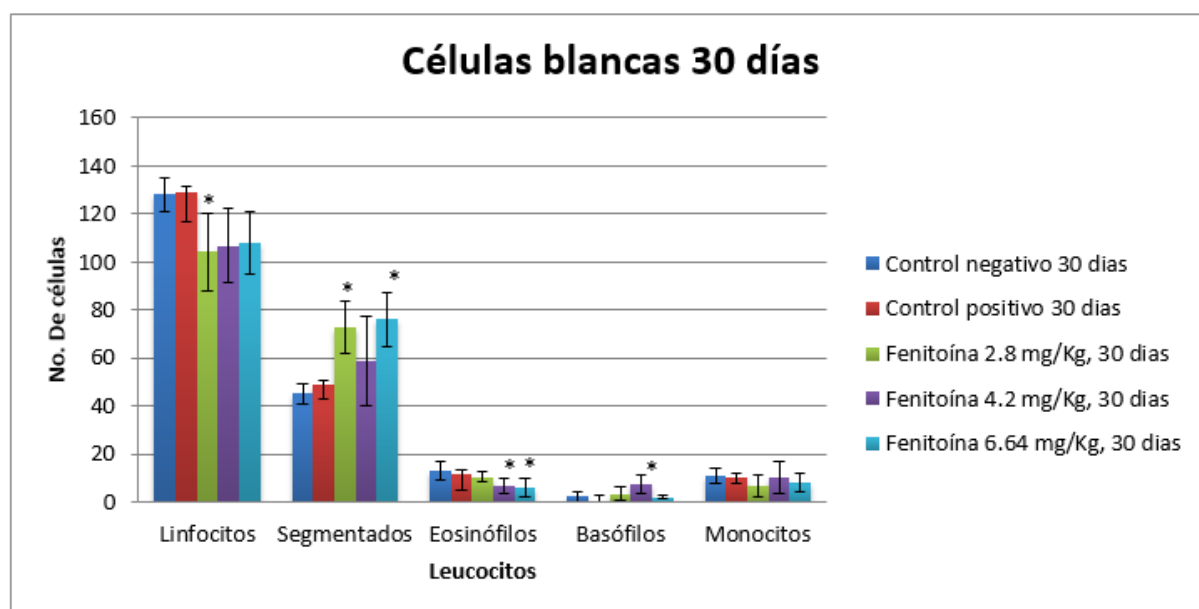


Fig. 17. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células a los 30 días. * Los linfocitos disminuyeron en la dosis de 2.8 mg/Kg, los segmentados aumentaron su proporción con las dosis de 2.8 y 6.64 mg/Kg, los eosinófilos disminuyeron su proporción con las dosis de 4.2 y 6.64 mg/Kg y finalmente los basófilos aumentaron solo en dosis d 4.2 mg/Kg.

Además, para finalizar con el aspecto citotóxico también se realizó el análisis estadístico contemplando todos los días de muestreo (24, 48, 72, 192 h, 15 y 30 días) para cada uno de los diferentes tipos de leucocitos y así poder evaluar el comportamiento celular de forma global (Figura 18 y Tabla 8). Para linfocitos la $F_{(obs)}=4.64 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ lo cual señala que sí hay diferencias significativas. La prueba de Dunnett ($p < 0.05$), señala que las tres dosis presentan diferencias estadísticamente significativas. En el caso de eosinófilos segmentados el valor calculado de $F_{(obs)}=12.26 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, determinando estadísticamente que sí hay diferencias significativas. La prueba de Dunnett ($p < 0.05$), señala que las 3 dosis tiene diferencias significativas.

Para los eosinófilos, basófilos y monocitos el valor de F calculada fue de $F_{(obs)}=0.71 < F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, $F_{(obs)}=0.61 < F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 2.87$ y $F_{(obs)}=0.50 < F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 2.87$ respectivamente, confirmando estadísticamente que no hay diferencias significativas entre ninguno de los lotes experimentales.

TABLA 8. Conteo de células blancas para cada tratamiento globales, evaluando la proporción de leucocitos en un conteo de 200 células de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). **Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y tratamiento significativamente diferente mediante comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo. Se observó que evaluando de forma global los tratamientos a los 30 días, solamente los linfocitos y segmentados poseen diferencias estadísticamente significativas con las 3 dosis administradas.

Leucocitos Global	$F_{(obs)}$	Comparación múltiple de Dunnett $p < 0.05$		
		Fenitoína 2.8 mg/kg	Fenitoína 4.2 mg/kg	Fenitoína 6.64 mg/kg
Linfocitos	4.64	0.040	0.040	0.040
Segmentados	12.26	0.050	0.050	0.050
Eosinófilos	0.71			
Basófilos	0.61			
Monocitos	0.50			

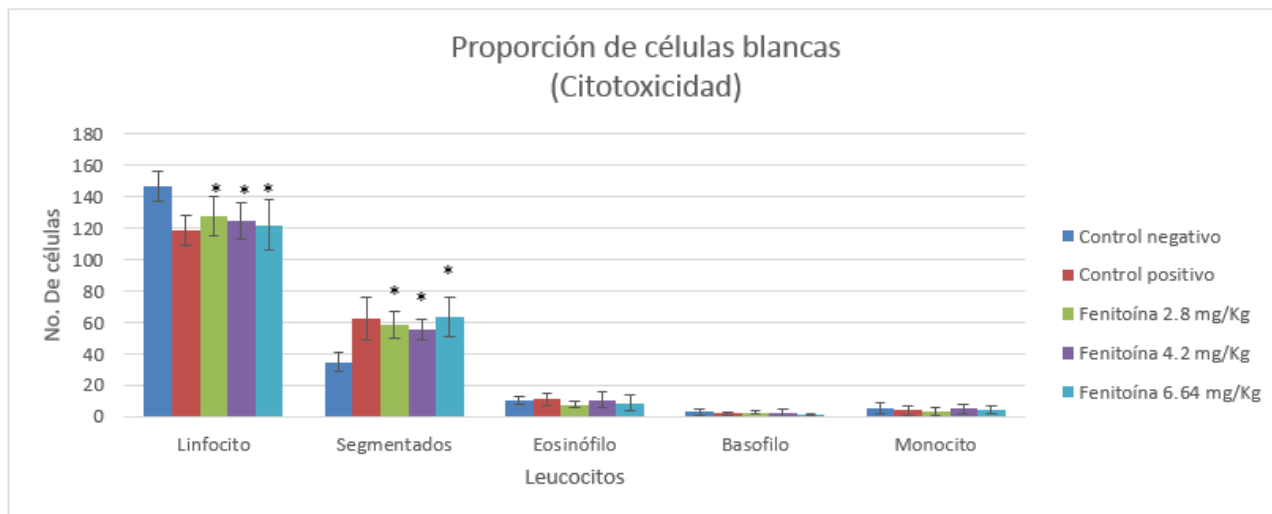


Fig. 18. Presenta la proporción de células blancas presentes en cada uno de los tratamientos, contemplando 200 células. Los linfocitos son los más presentes en todos los grupos pero disminuyen significativamente en los tres grupos experimentales, seguidos por los eosinófilos segmentados, los cuales están en una mayor proporción en todos los tratamientos en comparación con el control. Los 3 tipos celulares restantes no poseen diferencias.

Genotoxicidad

Se efectuó el análisis estadístico por cada día de muestro (24, 48, 72, 192 h, 15 y 30 días) para evaluar el comportamiento genotóxico de la fenitoína (Figura 19) De tal forma que los valores promedio señalaron lo siguiente:

Para las 24 h se obtuvo un valor de $F_{(obs)}=23.72 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$. Es decir, existen diferencias significativas en la presencia de células policromáticas micronucleadas con respecto al control negativo. La comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que las tres dosis de fenitoína presentan dicha diferencia significativa.

A las 48 h el valor fue de $F_{(obs)}=15.79 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ señalando que existen diferencias significativas. De igual forma, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) demostró que las 3 dosis poseen diferencias estadísticamente significativas.

El análisis estadístico a las 72 h arrojó un valor de $F_{(obs)}=25.49 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$ y a las 192 hs, el valor calculado fue de $F_{(obs)}=13.57 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, por tanto en estos dos días de muestreo existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. Para ambos días de muestreo la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) señaló que las tres dosis de fenitoína son estadísticamente diferentes.

A los 15 días el análisis estadístico tuvo un valor de $F_{(obs)}=12.22 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$. Es decir, nuevamente se presentó una diferencia estadísticamente significativa. Pero la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) señaló que únicamente la dosis de 6.64 mg/Kg fue diferente estadísticamente.

Por último, para los 30 días de muestreo se obtuvo un valor de $F_{(obs)}=50.14 > F_{4,20}^{\alpha 0.05}=3.239$, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células policromáticas micronucleadas con respecto al control negativo. La comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) señaló que nuevamente las tres dosis administradas presentaban dicha diferencia.

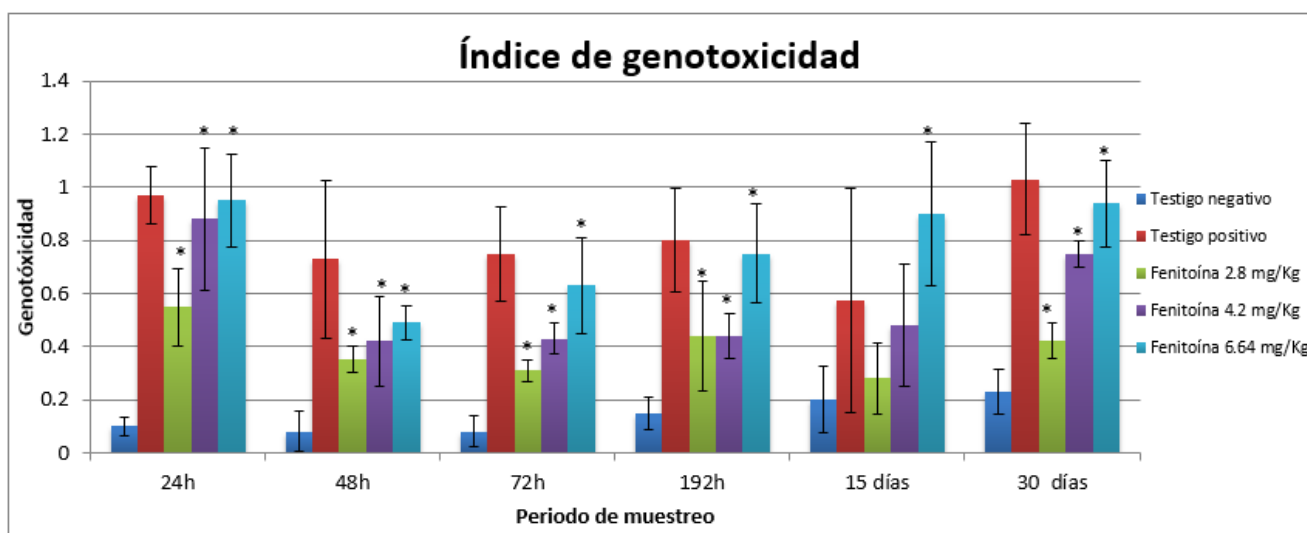


Fig. 19. Se observa el valor del índice de genotoxicidad por cada día de muestreo para todos los tratamientos. Observando el mayor incremento en el testigo positivo (cicloheximida) en todos los días de muestreo. A las 24 h las tres dosis de fenitoína presentaron una inducción de micronúcleos estadísticamente relevante, a las 48 h nuevamente las tres dosis presentaron dicha diferencia, a las 72 y 192 h se mantuvo la inducción de micronúcleos de forma significativa en las tres dosis. Para los 15 días únicamente la dosis de 6.64 mg/Kg de fenitoína presentó una inducción de micronúcleos estadísticamente significativa y finalmente a los 30 días nuevamente las 3 dosis fueron relevantes.

Finalmente, se procedió a realizar el análisis estadístico de forma global y se observaron los siguientes valores $F_{(obs)}=19.76 > F_{4,20}^{\alpha 0.05} = 3.239$, confirmando estadísticamente un efecto genotóxico en el ratón provocado por las diferentes concentraciones utilizadas de la fenitoína sódica (Figura 20). Dicho efecto se corroboró con la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

TABLA 9. Valores de genotoxicidad para cada tratamiento, evaluando el número de células policromáticas micronucleadas de sangre periférica de ratón (*Mus musculus*). Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y **múltiple de Dunnett con el testigo negativo.

Tratamiento	Genotoxicidad (Media)	Des.Est
Testigo negativo	0.140	0.064
Testigo positivo	0.809**	0.167
Fenitoína 2.8 mg/Kg	0.391**	0.099
Fenitoína 4.2 mg/Kg	0.566**	0.093
Fenitoína 6.64 mg/Kg	0.776**	0.065

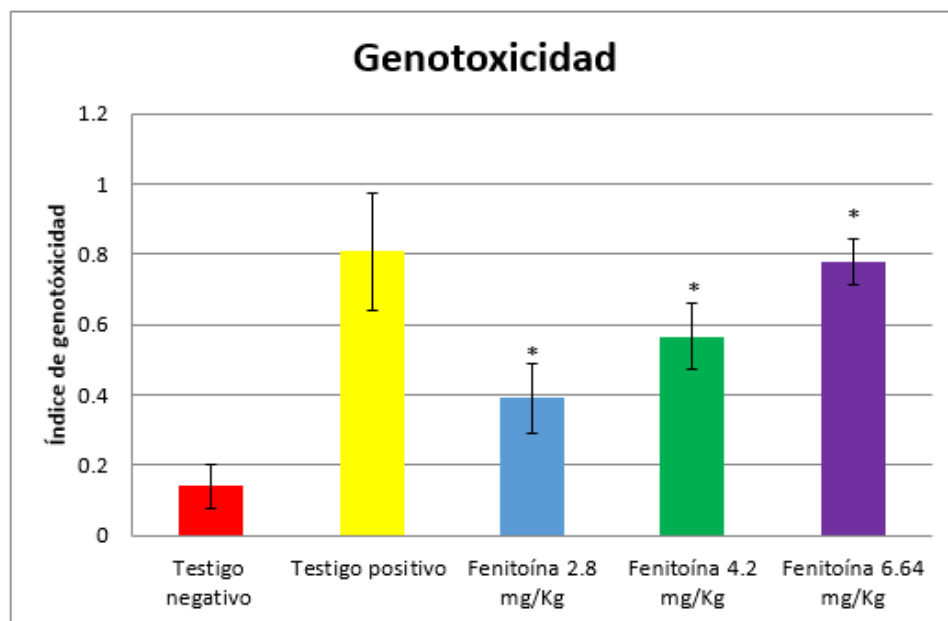


Fig. 20. Se observa el valor del índice de Genotoxicidad global de exposición para cada tratamiento. Observando el mayor incremento en el testigo positivo (cicloheximida), y un aumento significativo para cada concentración de fenitoína, con un comportamiento de: a mayor concentración mayor el efecto.

Por último en cuanto a los efectos teratogénicos, las disecciones no mostraron malformaciones o algún rasgo teratogénico a las concentraciones que fueron administradas. Sin embargo, se notó un descenso sobre la tasa de natalidad de los ratones.

DISCUSIÓN

La cicloheximida no dejó duda sobre su potencial tóxico y genotóxico, como aclara García en el 2008, que la cataloga como un inhibidor de la síntesis proteica y por ende genera una disminución en la proliferación celular. Además la cicloheximida interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional e Inhibe la función del factor de elongación eEF2 que media la translocación de la peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P.

En el análisis estadístico sobre los valores de la proporción de células policromáticas y normocromáticas con las dosis de fenitoína sódica de 4.2 y 6.64 mg/Kg mostraron un efecto inhibitorio en la diferenciación de las células policromáticas y normocromáticas. Según Hernández *et al.*, en el 2005, esta disminución de la proliferación celular está relacionada con la disminución de folatos a causa de la fenitoína, ya que se da una inhibición intestinal en 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 del retículo endoplasmático que originan una disminución de las concentraciones séricas de los folatos.

Por otro lado, los valores hematológicos que presentaron los ratones del testigo negativo se encuentran dentro del rango común, pues a diferencia de los humanos donde las células predominantes son los eosinófilos segmentados, en ratones y roedores en general los linfocitos comprenden del 55 al 75% de células dominantes seguidos por los eosinófilos segmentados, como lo señala el Centro de Investigación-Hospital General Universitario de Valencia (1989). El aumento en la presencia de eosinófilos segmentados, es común debido a que los antiepilépticos suelen generar reacciones adversas como irritaciones o erupciones cutáneas (*Rash* en inglés) como señala Soto *et al.*, (2011). Además, Estrella *et al.*, (2007) señalan que una variación de los niveles basales de linfocitos y eosinófilos segmentados está asociado con el Síndrome de Hipersensibilidad a Anticonvulsivantes

En cuanto a la genotoxicidad, las tres dosis usadas de fenitoína sódica demostraron sus propiedades clastogénicas. El comportamiento genotóxico siguió un patrón de concentración-respuesta, es decir al ser mayor la concentración mayor es el efecto genotóxico. 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 nuestro caso al ser un estudio semicrónico, se demuestra que a pesar de que el efecto inicial se da en las primeras 72 h, éste sí puede ser acumulativo. Por otra parte, Sardas *et al.*, en 1994, mediante estudios de intercambio de cromátidas hermanas, señalan 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, nuestro estudio demuestra que las dosis y el tiempo sí juegan un papel importante en el desarrollo del efecto genotóxico, basándonos en los datos de 192 h, 15 y 30 días.

De igual forma, Flores *et al.*, (2013) indican que el incremento de micronúcleos en las primeras 24 h y su posterior disminución hasta las 72 h, es debido 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 fueron capaces de “neutralizar” la acción de 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. Esta aclaración aunada a la respuesta inmune puede explicar la disminución del índice de inducción de MN a las 48 h.

Por otro lado, Lealgarza *et al.*, en 1990 determinaron el efecto genotóxico de la fenitoína mediante el uso de intercambio de cromátidas hermanas y recientemente Yüksel *et al.*, (2010) observaron el potencial genotóxico mediante la prueba de SMART, catalogándola como recombinógeno. A pesar de que Kindig *et al.*, en 1992 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 podemos afirmar que la fenitoína induce clastogénesis, aclarando que la concentración de fenitoína y la exposición crónica juegan un papel importante en la respuesta del efecto genotóxico.

Por último, en cuanto a los efectos teratogénicos, no se encontraron malformaciones a las concentraciones que fueron administradas. Sin embargo ya se ha establecido que la fenitoína causa teratogénesis a dosis mayores, a partir de los 10 mg/Kg para ratones, y sus efectos están altamente comprobados desde la clínica. Como señala Rebordosa y Aguilar en el 2004, la exposición a fenitoína sódica presenta efectos teratogénicos en un 3,3 % de la población expuesta al fármaco durante las primeras etapas del embarazo y éste se puede ver potenciado por el uso de más de 2 anticonvulsivos.

CONCLUSIONES

1. La fenitoína aumenta el índice de inducción de MN en eritrocitos policromáticos hasta un 0.776 con respecto al testigo negativo que fue de 0.140 en ratón cepa CD-1.
2. El grado del efecto genotóxico de la fenitoína es directamente proporcional a la concentración.
3. La fenitoína inhibe la proliferación de los eritrocitos policromáticos hasta un 3.773% con respecto al testigo negativo ratón cepa CD-1.
4. La fenitoína provocó un aumento en la proporción de eosinófilos segmentados hasta de un 98.53% con respecto al testigo negativo.
5. La Fenitoína no indujo teratogénesis a las dosis administradas en ratón cepa CD-1.
6. La cicloheximida aumentó el índice de inducción de MN hasta un 0.809 en comparación con el testigo negativo con valor de 0.140 e inhibió la proliferación de eritrocitos policromáticos hasta un 7.295%.
7. La cicloheximida provocó un descenso en los linfocitos de hasta 19.29% y un aumento en los eosinófilos segmentados de hasta un 79.001%, ambas proporciones con respecto al testigo positivo.

REFERENCIAS

- Asociación Española de Pediatría, Sociedad Española de Urgencias Pediátricas. 2010. "Protocolos diagnóstico-terapéutico de urgencias pediátricas SEUP-AEP- " S.A. pp.45-50
- Atlas Genetics Oncology, fecha de consulta 13 de agosto, 2013
- <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PolyMecaSp.html>
- Bañales, M. L. R. 2009. "Modelo experimental para evaluar la genotoxicidad transferida por la leche materna durante la lactancia". Universidad de Colima. Tesis. M. en C. México
- Beghi E, Carpio A, Forsgren L, Hesdorffer D, Malmgren K, Sander J. 2010. Recommendations for definition of acute symptomatic seizure. *Epilepsia*. No. 51:671-5.
- Bowman, W.C. 1990. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas. Interamericana. 18.22-18-24.
- Coutiño, E. 2011. Defensa química del citocromo P450: relación con la defensa inmune. *Revista Médica. UV*.
- Cuenca, P. y Ramírez V. 2004. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Revista de Biología Tropical*. No. 52 (3). 585-590.
- Estrella, V., Baroni, E., Leroux, MB., Sánchez, A., Bergero y R. Fernández Bussy. 2007. Síndrome de Hipersensibilidad a Anticonvulsivantes (SHA). *Revista Argentina de Dermatología*. No. 88. 46-54
- Falip M. y Codina M. 2011. *Epilepsia. Medicine*. 10 (74). 4991-5001.
- FDA. 2007. "Redbook". U.S. Department of Health & Human Services.
- Fernández, G., Gómez V., y Vallena C., 2007 "Tratamiento de la epilepsia durante el embarazo" *Revista de posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*. No.169. 19-23.
- Flores Maya, S, H. Barrera, Frausto, D. Chávez, A. Hernández, V. Herrera y L. Nájera. 2013. "Efectos citogenéticos de la fórmula comercial de una tableta antigripal en los eritrocitos de sangre periférica de ratón árabe (*mus*

musculus linnaeus, 1758)” Biología, Ciencia y Tecnología. Vol. 6(20). 388-397.

- Gallego, A. 2009. Aspectos fundamentales del citocromo P450. ADEMÁS comunicación gráfica. España.
- 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, 22
- Gurnee, M. 2001. Teratogenicity of drugs. Pharmacist.
- Hayashi, M, Hamada., S. Sizuyo, M. Takeshi, W. Akihiro, A. Shougo, H. Satoko, O. Shigenari, K. Koji, K. Madoka, S. Hiroyasu, O. Koji, k, Yasushi, A. Norihide, S. Sei-ichi, T. Hironobu, Y. Nobuhiro, R. Marshall, C. Moore, D. Blakey, L. Schechtman, J. Weaver, D. Torous, R. Proflock, S. itto, C. Namiki y. 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. No. 37. 93-110.
- Hayashi, M.J.T., J.T. MacGregor, G.D. Gatehous, 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 design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring”. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(3). 234-252.
- Hernández, R., Fernández, M., Miranda G., y Suástegui R. 2005. Disminución del ácido fólico y alteraciones cognitivas en pacientes con epilepsia tratados con fenitoína o carbamazepina, estudio piloto. Revista de Investigación Clínica. Vol. 57, No.4. 522-531.
- Henry, J. 1993. Diagnóstico y Tratamientos clínicos por el Laboratorio. Masson Salvat Medicina. 9ª. España.

- Katzung, M.D. 2005. Farmacología básica y clínica. El Manual Moderno. 381-402.
- Kiec'-Kononowicz, K., Stadnicka, K., Mitka, A., Pelaka, E., Filipeck, B., Sapa, J. y Zygmunt, M. 2002. Synthesis, structure and antiarrhythmic properties evaluation of new basic derivatives of 5, 5-diphenylhydantoin. European Journal of Medical Chemistry. No. 38. 555-566
- Kindig D. Garriot, M., Parton, J., Brunny, J. Beyers J. 1992. Diphenylhydantoin is not genotoxic in a battery of short-term cytogenetic assays. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 12 (1). 43-50.
- Krishna G. y Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research. No. w455. 155-166.
- Lealgarza, C., Valenciano, G., Cerda, R., Garza, R., 1990. Effect of sodium diphenylhydantoin (DPH) on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) in mice". Archivos de Investigación Médica. No. 21. 211-215.
- López, M., Rocha L., Miquel M., M. Hernández E., Toledo Cárdenas R., Coria G.A., García L., Pérez C. A., Aranda G. E. y Manzo J. 2009. Conceptos básicos de Epilepsia. Revista Médica de la Universidad Veracruzana. Julio – Diciembre. 32-37
- Luca, C. y Seoane, A. 2008. Cátedra de genética general. Mutaciones y Aberraciones cromosómicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. 1-14.
- Maloy, S. y Hughes, K. 2013. Brenner's Encyclopedia of Genetics. Academic Press. 2 Ed. 534-539.
- Mavournin, K., Blakey, D., Cimino, M., Salamone M. y J. Hewddle. 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Agency Gene-Tox Program. Mutation Research. No. 239. 29-80.
- Mayani, H., Flores, E., Pelayo, R. Montesinos, J., Flores, P. y Chavez A. 2007. Hematopoyesis. Cancerología No. 2. 95-107.
- MacGregor, J.T., C.M. Werh, 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(3). 513- 522.

- Pérez, A., Allende, M. Agustín, M. y Palomo P. 2002. Teratogenesis: clasificaciones. *Farmacia Hospitalaria*. 26 (3).171-177.
- Plant, J. 2003. *Molecular Toxicology*. BIOS Scientific Publisher. London.
- Rang y Dale. 2012. *Farmacología*. Elsevier Churchill Livingstone. 7ma Ed. 540.552.
- Rebordosa C. y Aguilera, C. 2004. Seguridad de los fármacos antiepilépticos durante el embarazo. *Medicina Clínica*.122 (17). 675-676.
- Rodak, B. 2005. *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Médica Panamericana
- Rubio, S. y García M. 1993. Utilización de fármacos durante el embarazo y la lactancia. *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*. 17 (1). 3-24.
- Sardas, S., Ada, M., Karakaya, A. y ydin N. 1994. Sister-chromatid exchanges in epileptic patients on anticonvulsant therapy. *Mutation Research*. No. 313. 21-24.
- Salamanca, F. 1988. "Citogenética humana: fundamentos y aplicaciones clínicas". Panamericana. México.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus Test. *Mutation Research*. No. 31. 9-15.
- Schmidt, R. y Wilder, B. 1968. *Epilepsy*. Philadelphia, Davis.
- Schousboe, A. 1991. Neurochemical alterations associated with epilepsy or seizure activity. In *Comprehensive epileptology*. 1ra ed. New York.1-16
- Smith, K. 1992. Spontaneous mutagenesis: experimental, genetic and other factors. *Mutation Research*. No. 227. 139-162
- Soto, A., Lavados M. y Araya F. 2011. Rash y anemia aplásica inducidos por fenitoína: caso clínico. *Revista Chilena de Neuro-psiquiatría*. No. 49. 171-176.
- Vázquez, B. Bautista, M. Segura, D. y Barral. J. 2014. *Farmacología General. Principios básicos*. UNAM. FES Iztacala.67-81.

- Velasco, P. 2011. "Determinación del posible efecto clastogénico de *Psittacanthus calyculatus* en sangre periférica de ratón CD1" Tesis. Licen. Biol. Iztacala.
- Wexler, Phil. 2014. Encyclopedia of Toxicology. Academic Press. 3ra. Ed.
- Yüksel M., Sarıkaya R. y Bostanci N. 2010. Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. Chemical Toxicology. No. 48, 2682-2687.
- Zuñiga. G., Torres, O., Zamora, A., Gómez, B. Ramos, M., Martínez, S., González, A. Luna, J. Ramos, A., Ontiveros, A. y Gallegos, M. 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. Mutation Research. No. 494. 161-167.