



Revista BIOCYT es editada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

CYTOGENETIC EFFECTS OF COMMERCIAL FORMULA OF AN ANTIFLU
TABLET IN PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES OF ARABIC MOUSE
(MUS MUSCULUS LINNAEUS, 1758)

EFFECTOS CITOGÉNÉTICOS DE LA FÓRMULA COMERCIAL DE UNA
TABLETA ANTIGRIPIAL EN LOS ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
DE RATÓN ÁRABE (MUS MUSCULUS LINNAEUS, 1758)

^{1,1}Saúl Flores Maya, ^{2,2}Barrera Escorcía Héctor, ^{3,3}Frausto Cornejo Alexis, ^{4,3}Chávez,
Vázquez Daniela Elizabeth, ^{5,3}Hernández Cruz Ana Cristina, ^{6,3}Herrera Valdés Valeria
Mariel y ^{7,3}Nájera Peña Laura Ivonne

¹Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, Estado de México, México, C.P. 54090. Laboratorio de Recursos Naturales
UBIPRO.

²Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, Estado de México, México, C.P. 54090. Laboratorio de Microscopia.

³Universidad del Valle de México campus Lago de Guadalupe Prol. Paloma No.7 Col. Lago de
Guadalupe, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.C.P.54760.

ABSTRACT

The mixture of an analgesic, antipyretic and antihistamine of an antifu tablet were examined for both cytotoxicity and ability to induce chromosomal damage in peripheral blood erythrocytes of arabic mouse. The chromosomal damage was assessed using an in vivo micronucleus assay. The antifu tablet was administered to mice orally at a dose of 10.6 mg / kg body weight over the course of eight hours for three days in an acute treatment. The evaluation of the toxic effects of antifu on the peripheral blood erythrocytes of arabic mouse did not show a statistically significant difference between the group with acute treatment and the negative control. Instead, this Antifu showed significant genotoxic effects at 24, 48 and 72 hours after application. This effect may be due to the chemical components of antifu such as paracetamol and caffeine. In conclusion, The mixture of Paracetamol 500 mg, caffeine 25 mg, phenylephrine hydrochloride 5 mg, chlorpheniramine maleate 4 mg do not cause cell damage but showed clastogenic damage during acute treatment in mice Arabic line. The Arabic mouse showed sensitivity to the effects of these agents, and therefore this organism should be included for genotoxicity studies.

Key Words: Analgesic, antipyretic, antihistamine, micronucleus, normochromatic, polychromatic

Correspondence to author

^{1,1} saulsel@unam.mx

^{2,2} hectorbarrerae@hotmail.com

^{3,3} alex.frst23@hotmail.com

^{4,3} daniela7722@hotmail.com

^{5,3} anizz_star@hotmail.com

^{6,3} vale_64girl@hotmail.com

^{7,3} bugyivonne@hotmail.com

Manuscrito recibido el 29 de septiembre de 2012, aceptado el 20 de enero de 2013.

RESUMEN

La mezcla de analgésico, antipirético y antihistamínico de una pastilla antigripal de marca conocida fue evaluada en su capacidad de provocar daño cromosómico y citotoxicidad en sangre periférica de ratón árabe. El daño cromosómico fue evaluado utilizando la prueba de micronúcleos in vivo. El antigripal fue administrado a ratones de la línea árabe por vía oral en una dosis de 10.6 mg/Kg de peso en el curso de ocho h por tres días en un tratamiento agudo. Los cálculos del índice de toxicidad no fueron significativos estadísticamente entre los datos del grupo control negativo y los tratamientos con el antigripal. En cambio, este antigripal mostró efectos genotóxicos significativos a las 24, 48 y 72 h después de su aplicación. Este efecto puede ser causa de los componentes químicos del antigripal como son el paracetamol y la cafeína. En conclusión, la mezcla de analgésico, antipirético y antihistamínico de una pastilla antigripal no provoca daño celular pero muestra daño clastogénico durante el tratamiento agudo del antigripal en ratones de la línea árabe. El ratón Árabe mostró sensibilidad a los efectos de los agentes genotóxicos y, por tanto, este organismo debería ser incluido para estudios de genotoxicidad.

Palabras clave: Analgésico, antipirético, antihistamínico, micronúcleos, normocromáticos, policromáticos

INTRODUCCIÓN

No existe ningún medicamento que cure la gripe ni antivirales que destruyan al virus de la gripe. Todos los medicamentos de venta libre o los prescritos por los médicos actúan sintomáticamente, es decir que alivian los síntomas producidos por esta enfermedad: fiebre, dolores musculares y articulares, congestión nasal, tos, etc. En general los de venta libre no contienen todas las sustancias o no corresponden las dosis en relación a las recetas (Salud y Medicinas, 2013).

Los productos químicos encontrados en estas pastillas pueden tener un efecto profundo en el cuerpo y desencadenar una serie de efectos secundarios como un daño a algún órgano o a nivel celular. Su combinación con otros medicamentos como antidepresivos, anticonceptivos y otros ingredientes activos pueden causar somnolencia, visión borrosa, mareos, cambios de humor, etc. En el ámbito internacional la evaluación genotóxica de nuevos medicamentos es un requisito de carácter obligatorio y aunque no existe un consenso generalizado sobre qué tipos y qué cantidad de pruebas de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, a los productos químicos de acuerdo a los resultados obtenidos mediante ensayos genéticos (Hayashi et al., 2000).

La prueba de micronúcleos (MCN) ayuda a detectar el efecto de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosómicos que quedan rezagados en la mitosis, los cuales quedan fuera del núcleo formando los micronúcleos. La técnica permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas) como aneuploidogénicos (que afectan el uso mitótico) (Schmid, 1975).

En los 91 volúmenes de monografías sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los humanos publicados entre 1972 y 2007 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC sus siglas en inglés) examinó más de 200 medicamentos, incluyendo al paracetamol, el cual fue considerado no clasificable en cuanto a carcinogenicidad en los seres humanos (Brambilla y Martelli, 2009).

Como señalaron Blagoeva et al., (1991), de acuerdo a Aeschbacher y su equipo de laboratorio en 1986, la cafeína por sí sola cuando es aplicada en una dosis de 100 mg/Kg puede

causar daño cromosómico *in vivo*, demostrado por la formación elevada de micronúcleos en ratones exogámicos CD-1 o en ratones endogámicos MS/Ae. El paracetamol muestra resultados positivos y negativos en ensayos de genotoxicidad o carcinogenicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Con respecto a los ensayos de carcinogénesis, el paracetamol aplicado en dosis inferiores a la recomendada en una dosificación de tiempo corto para el hombre fue probado en ratones, esta dosificación dio resultados negativos en los ensayos *in vivo* de carcinogenicidad. En cambio, la dosificación a largo plazo en la prueba de carcinogénesis, el paracetamol fue carcinogénico para ratones.

Rannug et al., (1995), señalaron que en estudios *in vitro* e *in vivo* los metabolitos secundarios del paracetamol son capaces de unirse covalentemente al ADN. Es un hecho que una de las isoenzimas del citocromo P450 es la responsable para la bioactivación de paracetamol (P450 2EL), la cual se ha encontrado en los linfocitos de sangre periférica humana, lo que indicaría que los metabolitos secundarios podrían ser responsables de inducir aberraciones cromosómicas.

Brambilla y Martelli (2007), consideran que los efectos genotóxicos cancerígenos se pueden producir en los seres humanos por los compuestos N-nitrosos formados en el ambiente gástrico mediante la reacción con nitrito de analgésicos, anti-inflamatorios no esteroideos y antipiréticos que son fármacos de amina teóricamente nitrosables.

La identificación de MCN en eritrocitos de sangre periférica de mamíferos, aves, reptiles y anfibios depende básicamente de la eficiencia del sistema retículo endotelial, que es el responsable de eliminar los eritrocitos anómalos y/o viejos. A mayor eficiencia de eliminación es menor la posibilidad de observar eritrocitos con micronúcleos (MCNCP), independientemente de si el organismo está expuesto a agentes genotóxicos o no. Esto ha sido ampliamente documentado con el objetivo de seleccionar las especies con mayor sensibilidad, que posteriormente, puedan ser utilizadas como indicadores o monitores biológicos en presencia de agentes tóxicos al genoma (MacGregor et al., 1990).

El uso indiscriminado de antigripales se incrementa durante el cambio de estación y constituye una peligrosa costumbre que puede ocasionar diversos daños a la salud, como intoxicaciones (con cuadros de náuseas, mareos y desmayos) y hasta taquicardia u otras afecciones cardiovasculares. Entre las reacciones adversas más comunes por el abuso de estos fármacos, está el dolor de estómago y las náuseas. Entre las más graves y peligrosas están las hemorragias y problemas cardiovasculares que podrían conducir a la muerte. Por esta razón, que este estudio se realizó para determinar si existen daños genéticos por el uso de estos medicamentos de venta libre. En el presente trabajo surgió la siguiente interrogante: ¿El consumo de este antigripal provoca daños citogenotóxicos? Para dar respuesta a esta pregunta se establecieron los siguientes objetivos: Determinar el efecto citogenotóxico de una pastilla antigripal durante un tratamiento de 72 hs (tratamiento agudo) en células de sangre periférica de ratón Árabe y analizar la sensibilidad de respuesta a daños citogenotóxicos inducidos y espontáneos en el ratón de la cepa árabe (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) para proponerlo como modelo biológico para la prueba de micronúcleos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medicamento

Una pastilla antigripal de marca conocida de venta libre. (Por causas externas a este estudio se evitó escribir el nombre del medicamento estudiado).

Forma farmacéutica y formulación

Es importante señalar que la siguiente formulación es similar en varios productos antigripales.

Cada tableta contiene

Paracetamol al 90% equivalente a 500 mg de paracetamol; cafeína 25 mg; clorhidrato de fenilefrina 5 mg; maleato de clorfenamina 4 mg. excipiente, c.b.p. una tableta.

Indicaciones terapéuticas

Analgésico, antipirético y antihistamínico.

Dosis y vía de administración

La vía de administración es oral: Adultos y niños mayores de 12 años, una tableta cada ocho horas. Importante no exceder la dosis recomendada.

Solución stock del antigripal

Se disolvió una tableta en 4.5 ml de agua destilada (dosis 534 mg/Kg de peso). De esta solución se tomaron 0.3 ml (10.6 mg/Kg de peso), los cuales fueron aplicadas en forma oral cada ocho horas por tres días a cada uno de los roedores.

Material biológico

Para llevar a cabo el análisis genotóxico y conocer su sensibilidad a estas pruebas se seleccionaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa Árabe. Estos organismos son de fácil adquisición y ampliamente comercializados en ceparios de mascotas conocidos como +KOTA[®].

El trato y el mantenimiento de los animales siguieron los protocolos establecidos por la Norma Oficial Mexicana 3R (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Ratones árabes machos de cinco a seis semanas de edad fueron puestos en condiciones de laboratorio. Después de una semana de aclimatación, los organismos fueron divididos en cinco lotes. Cada lote con cinco ratones.

Diseño experimental

Los lotes fueron distribuidos de la siguiente manera: un control negativo administrado solo con agua destilada; un control positivo que correspondió a la exposición en 0.3 ml de ifosfamida que se aplicó solo una vez a los ratones de forma intraperitoneal y que corresponde a una dosis de concentración de 60 mg/Kg de peso. Se eligió a la ifosfamida (Ifex[®]) como control positivo por ser un agente alquilante que produce un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos a 24 y 48 h de exposición en sangre de ratón (Álvarez-González et al., 2001). Finalmente se diseñaron tres lotes experimentales que fueron asignados a la exposición al antigripal por 24, 48 y 72 h. Estos tiempos corresponden a la dosis recomendada para disminuir las molestias del resfriado común y también corresponde a tres ciclos celulares de los eritrocitos en ratones.

Posterior a la administración de la dosis, se procedió a extraer sangre realizando una punción en la zona caudal de los ratones a las 24, 48 y 72 h. Una gota de sangre se depositó sobre una laminilla y se procedió a realizar un frotis (tres laminillas por ratón). Inmediatamente se fijaron las muestras con metanol. Las laminillas fueron sometidas a un tren de tinción de hematoxilina/eosina por 10 minutos.

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones fueron contabilizadas auxiliándose de un microscopio óptico Motic B1 y posteriormente fotografiadas con una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. En donde se observó un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de micronúcleos (MCN) en células policromáticas (MCNCP) por ratón y por día. El porcentaje (%) de toxicidad se calculó de la siguiente manera: % Toxicidad: [No de CP/No de

CN] X 100 y % Genotoxicidad: % MCN= No. de MCN en CP /2000 células totales X 100 (Wakata et al., 1998; Hayashi et al., 2000; Krishna y Hayashi, 2000; Hamada et al., 2001; Remigio et al., 2007; Cottelle et al., 2012).

Los datos fueron organizados en tablas y los resultados promediados fueron analizados estadísticamente con la prueba paramétrica ANOVA de un factor y una prueba de comparación múltiple conocida como Dunnett ($p < 0.05$) (Ma et al., 1995).

RESULTADOS

Los resultados estadísticos de la comparación entre los valores medios del efecto toxicológico, se analizaron con el valor calculado (*obs*) de F el cual fue: $F_{obs} = 1.41 < F_{4,15}^{0.05} = 3.06$, determinando estadísticamente que no hubo diferencias significativas, es decir no hubo algún efecto de toxicidad de los componentes del antigripal sobre las células sanguíneas del ratón Árabe (Tabla 1; Fig. 2). La sobrevivencia y actividad biológica de las células sanguíneas no fueron alteradas en estos tiempos de exposición al antigripal (Fig. 1) además, los roedores no mostraron síntomas de daño en su salud ya que estos continuaron con una actividad normal.

En cambio, la frecuencia de las células micronucleadas de los grupos expuestos al antigripal mostró un incremento durante el tratamiento agudo, resaltando este efecto a las 48 h después de ser aplicado el medicamento. Esto fue corroborado en el análisis estadístico de ANOVA cuyo valor de F fue: $F_{obs} = 6.77 > F_{4,15}^{0.05} = 3.06$ y la prueba de comparación Múltiple de Dunnett ($p < 0.05$), señalando que hubo un efecto genotóxico (Fig. 3).

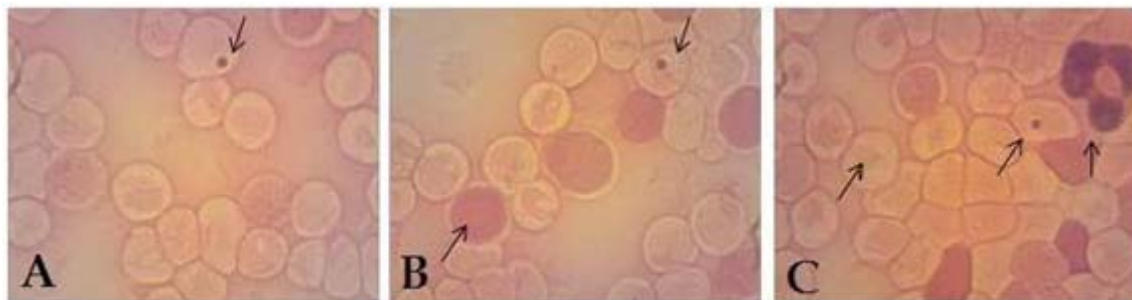


Fig. 1 Células de sangre periférica de ratón Árabe expuesta a 10.6 mg/Kg de peso de un antigripal combinado con paracetamol 500 mg, cafeína 25 mg, clorhidrato de fenilefrina 5 mg y maleato de clorfenamina 4 mg. En la fotografía A se aprecia claramente una célula con un micronúcleo (flecha); B se muestra a un micronúcleo en células normocromáticas y una célula policromática con núcleo rosa-azul (flechas); C se observa una célula policromática y otra con micronúcleo y una célula eosinófila (flechas). Tinción de Hematoxilina de Harris y eosina. Aumentos de 1000x.

Tabla 1. Efecto citogenotóxico de una pastilla antigripal sobre la proporción de células policromáticas con células normocromáticas (%T) y la frecuencia de micronúcleos (%G) en células policromáticas de sangre periférica de ratón Árabe. *Diferencia significativa $p < 0.05$ en Prueba ANOVA de un factor y **Múltiple de Dunnett con control negativo. Promedio de 8000 células entre un tratamiento y su repetición.

Variable	Tratamiento	$\bar{x} \pm$	Desv. Est.
Toxicidad (%) T CEP/CEN X 100	control negativo H ₂ O	6.8	± 1.7
	control positivo Ifosfamida	6.0	± 0.5
	60 mg/Kg de peso antigripal 0.30 mg/Kg de peso 24 h.	18.1	± 4
	antigripal 0.30 mg/Kg de peso 48 h.	24.9	± 2.6
	antigripal 0.30 mg/Kg de peso 72 h.	15.4	± 1.3
	control negativo H ₂ O	0.025	± 0.0
Genotoxicidad (%) G (MCNCEP/2000)X 100	**control positivo Ifosfamida	1.43	± 0.03
	60 mg/Kg de peso *antigripal 0.30 mg/Kg de peso 24 h.	0.53	± 0.02
	**antigripal 0.30 mg/Kg de peso 48 h.	0.95	± 0.08
	*antigripal 0.30 mg/Kg de peso 72 h.	0.23	± 0.01

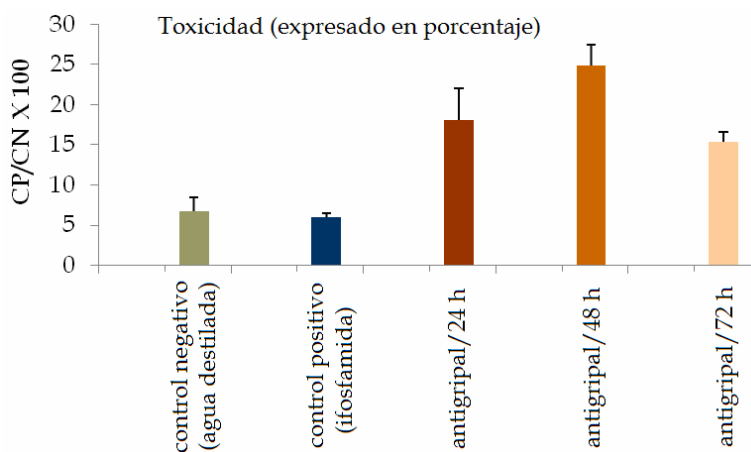


Fig. 2. Valores de las células policromáticas en sangre periférica de ratón Árabe expuestas a 10.6 mg/Kg de peso de un antigripal combinado con paracetamol 500 mg, cafeína 25 mg, clorhidrato de fenilefrina 5 mg y maleato de clorfenamina 4 mg, durante 24, 48, 72 h. Datos promedio y su desviación estándar de 8000 células entre un tratamiento y su repetición. No hay diferencia significativa en una $p < 0.05$ utilizando la prueba de ANOVA de un factor.

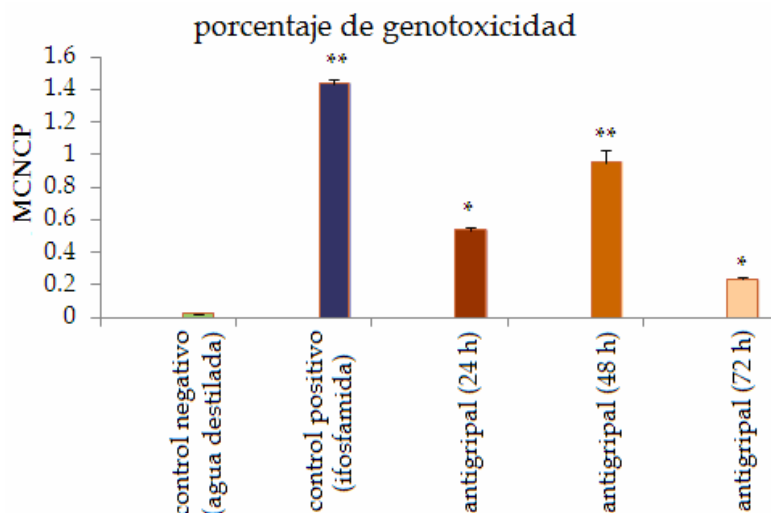


Fig. 3. Micronúcleos en las células policromáticas en sangre periférica de ratón Árabe expuestas 24, 48, 72 h en una dosis de 10.6 mg/Kg de peso de un antigripal combinado con paracetamol (500 mg), cafeína (25 mg), clorhidrato de fenilefrina (5 mg) y maleato de clorfenamina (4 mg). durante 24, 48 y 72 h (expresado en porcentaje). Datos promedio y su desviación estándar de 8,000 células entre un tratamiento y su repetición. *Diferencia significativa en una $p < 0.05$ utilizando la prueba de ANOVA de un factor y la prueba **Múltiple de Dunnett con control negativo.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que la administración de 10.6 mg/Kg de peso de los componentes del antigripal durante un tratamiento agudo en ratones causó daño genotóxico en sus células sanguíneas periféricas. Convencionalmente la respuesta celular a esta dosis no se traduce en una frecuencia alta de micronúcleos a las 24 h de su exposición, pero sí va teniendo un efecto de incremento significativo de micronúcleos a las 48 horas (segundo), esto significa que el daño es acumulativo. Sin embargo, al analizar las muestras de sangre extraída a las 72 horas después de la aplicación de la dosis del antigripal la ocurrencia de micronúcleos en células policromáticas comenzó a disminuir, considerando así que la dosis aplicada en los tiempos de exposición presentan un daño clastógeno no prolongado después de 48 horas (Fig. 1). Esto confirma lo mencionado por Hayashi et al., (2000), en los ensayos agudos, en donde el clastógeno actúa rápidamente y no presenta un efecto acumulativo, el régimen de exposición generalmente recomendado para una prueba de rutina es de una sola administración o bien dos con 24 horas de diferencia entre ellas, pues con ello se asegura que el compuesto a probar actúe en las células dentro de su período de maduración

Se observó una disminución de micronúcleos a las 72 h después de su aplicación, la cual podría estar directamente relacionada: 1) al proceso natural de reparación genética de las células y 2) posiblemente a que el sistema retículo endotelial (SRE), particularmente del bazo y la médula ósea de los organismos, fue capaz de neutralizar y/o metabolizar al agente químico administrados. Se sabe que las células de estos órganos son las encargadas de fagocitar a través de sus membranas todos los elementos agresivos para el organismo (sustancias tóxicas, bacterias, hongos, etc.) (Fig. 2) que penetran el intestino a través de la vena porta (MacGregor et al., 1990). En este mismo rubro la transformación de los componentes químicos del antigripal por el metabolismo de los roedores no dio origen a compuestos secundarios que provocaran daños citotóxicos en la dosis y tiempos (tratamiento agudo) usados en el presente estudio y que son los mismos para la dosificación de los fármacos en la salud humana.

Actualmente se sabe que algunos componentes del antigripal como el paracetamol y la cafeína por sí solos son capaces de inducir daño cromosómico en células de mamíferos *in vitro*. Este daño genético fue evaluado usando la prueba de micronúcleos *in vitro*. (Dunn et al., 1987). Estos mismos investigadores observaron que la mezcla aspirina, fenacetina y cafeína (AFC) no indujeron micronúcleos, y la combinación paracetamol-codeína no incrementaron el nivel de micronúcleos (Dunn et al., 1987).

Los ratones utilizados en este estudio fueron eficientes y altamente sensibles al mutágeno. Como se observa en la Tabla 1, los resultados inducidos por la ifosfamida y los tratamientos con el antigripal fueron altos como se esperaba y además los datos obtenidos en el control negativo (efectos genéticos espontáneos) fueron los más bajos. Es importante mencionar que las especies que presentan MCN espontáneamente, el control que ejerce el bazo es menor y por consiguiente, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos, los MCN se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos, lo que también fue observado en el presente estudio (Fig. 3). Por tanto, se proponen a los ratones de la línea árabe como candidatos para ser utilizados como modelo biológico en el ensayo de micro núcleos en sangre periférica. Sin embargo, se necesitan realizar más experimentos de genotoxicidad utilizando otros marcadores genéticos como: Aberraciones Cromosómicas, Intercambio de Cromátides Hermanas, Índice Mitótico y daños en la molécula de ADN para incluir a esta especie como un bioindicador de genotoxicidad.

El presente trabajo inicia la posibilidad de utilizar a esta especie comercial para pruebas genotóxicas. En conclusión a) este antigripal no tiene efectos citotóxicos porque no hay disminución en la proporción CP/CN; b) la combinación de paracetamol-clorhidrato de fenilefrina-cafeína-maleato de clorfenamina (con proporción de 500, 25, 5 y 4 mg respectivamente) sí inducen daño clastogénico o aneugénico en un tratamiento agudo (72 horas), por lo que se pensaría que posiblemente con una dosificación crónica o abuso de este antigripal sin prescripción médica se tendrán efectos mutagénicos prolongados y c) esta inferencia sugiere la realización a corto plazo de protocolos enfocados a investigar el uso de este antigripal en una terapia crónica y con la opción de emplear otros biomarcadores genéticos.

REFERENCIAS

1. Álvarez-González, I., E. Madrigal-Bujaidar, V. Dorado y J.J. Espinosa-Aguirre, 2001. Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutation Research*, 480-481: 171-178.
2. Blagoeva, M.P., M. R. Balansky y J.T. Mircheva, 1991. Potentiation by caffeine of the frequencies of micronuclei induced by mitomycin C and cyclophosphamide in young mice. *Mutation Research*, 246: 123-127.
3. Brambilla, G. y A. Martelli, 2007. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. *Mutation Research*, 635(1): 17-52.
4. Brambilla, G. y A. Martelli, 2009. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. *Pharmacological Research*, 60: 1-17.

5. Cotelle, S., R.C. Testolin, A.S. Foltête, G.B. Rissardi, R.A. Silveira y C.M. Radetski, 2012. Genotoxicity potential of a new natural formicide. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 628-635.
6. Dunn, T.L., R.A. Gardiner, G.J. Seymour y M.F. Lavin, 1987. Genotoxicity of analgesic compounds assessed by an in vitro micronucleus assay. *Mutation Research*, 189(3): 299-306.
7. Hamada, S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, S. Ozawa, K. Kondo, M. Nakajima, H. Shimada, K. Osawa, Y. Kondo, N. Asano, S. Sato, H. Tamura, N. Yajima, R. Marshall, C. Moore, D.H. Blakey, L.M. Schechtman, J.L. Weaver, D.K. Torous, R. Proudlock, S. Ito, C. Namiki y M. Hayashi, 2001. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37(2): 93-110.
8. Hayashi, M.J.T., J.T. Mac Gregor, 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 desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3): 234-252.
9. Krishna, G. y M. Hayashi, 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455: 155-166.
10. Ma, T.H., X. Zhoug, G.G. Arreola y S.U. Leucona, 1995. Mouse-erythrocyte micronucleus (Mus-EMN) assay on the clastogenicity of industrial wastewater. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 11(2): 95-98.
11. 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.
12. NOM-062-ZOO-1999 (Norma Oficial Mexicana), Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
13. Rannug, A., A.K. Alexandrie, I. Persson y M. Ingelman Sundberg, 1995. Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37: 25-36.

14. Remigio, M.A.C., J.P. Ferrer, Y.V. Hurtado, C.R. Ferrala y C. Carballo, 2007. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 12(2) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962007000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 1028-4796 (accesado en febrero 11, 2013).
15. Salud y Medicinas. 2013. <http://www.saludymedicinas.com.mx/centros-de-salud/gripe/temas-relacionados/antigripales.html> (accesado en febrero 26, 2013).
16. Schmid, W., 1975. The micronuclei test. Mutation Research, 31:9-15.
17. Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo y M. Hayashi, 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. Environmental and Molecular Mutagenesis, 32: 84-100.