



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“ESTUDIO GENOTOXICO DE UN
DERIVADO DE LA 1,4-DIHIPIDIRIDINA
(DHP-4) EN CULTIVO DE LINFOCITOS
HUMANOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

SARA HERNANDEZ MATILDE

ASESORA: M. en C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999

ESIS CON
A DE ORIGEN

2008/09



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.



ERIDAD NACIONAL
AVEN-MA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Química Farmacéutica y Biología

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio genotóxico de un derivado de la 1,4-dihidropiridina
(DHP-4) en cultivo de linfocitos humanos".

que presenta la pasante: Sara Hernández Matilde
con número de cuenta: 8958871-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 23 de Marzo de 1999 g.

PRESIDENTE Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

VOCAL Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barriqa Arceo

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Víctor M. Zendejas Buitrón

A Dios

Señor, te escribo para agradecerte la vida.

Por que, me has dado una flor blanca muy hermosa con perfumes de amor, cariño y comprensión, que es mi MADRE, quien es la persona más valiosa de mi vida.

Por que, yo tengo a mi PADRE, quien es un hombre bueno y me ha enseñado el camino de la vida.

Por que, he visto crecer a cuatro estrellitas que brillan en la inmensidad, con las más hermosas sonrisas y un alma inocente: BRYAN JOSEPH, JOSE MARTIN, VICTOR URIEL y JAIR.

Por que, si la ciencia es la luz, tú has iluminado a la maestra SANDRA, para que yo la encontrara, depositando en ella la herencia del universo.

Por que, en ISAIAS encontré una amistad sincera y un corazón dulce con muestras de afecto y sobre todo comprensión.

Por que, has permitido que mis ojos, vuelvan a ver la inmensidad de tú creación.

GRACIAS

SARA.

Dedico este trabajo a mis PADRES Victoria y Juan Margarito, a mis hermanas Maria del Carmen y Leticia, y a toda la familia MATILDE.

Agradezco infinitamente a la familia Matilde Sánchez, por su apoyo, especialmente a ti JOEL.

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| Resumen | 2 |
| Indice de figuras | 3 |
| Abreviaturas | 4 |
| I. Introducción | 5 |
| 1.1 Hipertensión | 5 |
| 1.1.1 Clasificación de los antihipertensivos | 9 |
| 1.2 Canales de calcio | 10 |
| 1.2.1 Estructura molecular | 11 |
| 1.2.1.1 Canales de calcio tipo L | 15 |
| 1.2.2 Función | 15 |
| 1.3 Características de los antagonistas de calcio | 18 |
| 1.3.1 Dihidropiridinas | 20 |
| 1.3.1.1 Antecedentes | 21 |
| 1.4 Tratamiento de la hipertensión con antagonistas de calcio | 23 |
| 1.5 Estudios de genotoxicidad | 28 |
| 1.5.1 Intercambios de cromátidas hermanas | 29 |
| 1.5.2 Mecanismo | 30 |
| II. Hipótesis y objetivos | 33 |
| 2.1 Hipótesis | 33 |
| 2.2 Objetivos | 33 |
| 2.2.1 Objetivo general | |
| 2.2.2 Objetivos particulares | |
| III. Método | 34 |
| 3.1 Material biológico | 34 |
| 3.2 Material y equipo | 34 |
| 3.3 Reactivos | 35 |
| 3.4 Procedimiento | 35 |
| IV. Resultados | 39 |
| V. Discusión | 47 |
| VI. Conclusiones | 50 |
| VII. Bibliografía | 51 |

RESUMEN:

La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo más importantes de accidentes cardiovasculares en México, ya que son la principal causa de mortalidad en hombres y mujeres.

En el tratamiento de la hipertensión arterial, los antagonistas de calcio como las 1,4-dihidropiridinas, son de los más utilizados, porque disminuyen la presión arterial de manera muy eficaz, producen pocos efectos adversos y suelen ser bien tolerados.

Por esta razón en los últimos años en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se ha desarrollado una línea de investigación orientada a la síntesis y valoración biológica de nuevos compuestos 1,4-dihidropiridínicos.

Dentro de las investigaciones preclínicas a nuevos fármacos se encuentran los estudios genotóxicos, una de las pruebas de estudio para determinar el potencial mutagénico de las 1,4-dihidropiridinas, es mediante la detección de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) que permite conocer la respuesta celular ante agentes que lesionan al ácido desoxirribonucleico.

El presente trabajo consistió en evaluar la frecuencia de ICH en cultivo de linfocitos humanos a las concentraciones de 0.08, 0.4, 0.8 y 1.2 $\mu\text{g/mL}$ de DHP-4 y nifedipino, tomando a esta última molécula de comparación, debido a que es la estructura base. Además se evaluaron el índice de replicación y mitótico.

Los resultados obtenidos de la frecuencia de ICH dependen de la concentración de las 1,4-dihidropiridinas. En cuanto a los parámetros de citotoxicidad tanto el índice de replicación y mitótico se modifican apartir de la primera concentración de estos compuestos.

Comparando los resultados de ambos compuestos se apreció que DHP-4 provoca menor número de ICH en relación a la concentración, perfilándose como un buen compuesto para la hipertensión arterial.

INDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Regulación de la presión arterial | 6 |
| 2. Figura de las cifras tensionales normales en relación con la edad y sexo.. | 7 |
| 3. Estructura molecular de los canales de calcio..... | 11 |
| 4. Arbol filogenético de la subunidad α -1..... | 12 |
| 5. Topología de la subunidad α -1..... | 13 |
| 6. Modelo estructural para el canal de calcio..... | 14 |
| 7. Calcio intracelular..... | 17 |
| 8. Representación de los movimientos de calcio en la fibra lisa..... | 19 |
| 9. Síntesis de Häntzsch. | 22 |
| 10.Estructura de 1,4-dihidropiridina (DHP-4) | 22 |
| 11.Prescripción de los antagonistas de calcio..... | 26 |
| 12.Ilustración de los Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)..... | 30 |
| 13.Ilustración del mecanismo de ICH..... | 32 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AC | Antagonistas de calcio |
| Ca ²⁺ | calcio |
| CD4+ | linfocito T cooperador |
| DHP-4 | 1,4-fenilmetoxi-dihidropiridina |
| ECA | enzima convertidora de la angiotensina |
| IL-1 | interleucina 1 |
| IL-2 | interleucina 2 |
| IL-2R | receptor de interleucina 2 |
| InP3 | D-myo-inositol-1,4,5-trifosfato |
| ICH | intercambios de cromátidas hermanas |
| µg | microgramos |
| PHA | fitohemaglutinina |
| mV | milivolts |

I. INTRODUCCION

1.1 HIPERTENSION.

La presión arterial es un mecanismo en perfecto equilibrio para mantener la irrigación adecuada de los diversos órganos. Su regulación y control dependen fundamentalmente del débito cardíaco y de las resistencias periféricas (figura 1). Los sistemas que intervienen en el mantenimiento de la presión arterial normal se clasifican en tres tipos:

- a) Sistemas a corto plazo, representados por el seno carotideo.
- b) Sistemas a plazo medio, que consiste en la propiedad que tienen las arterias de alargarse cuando la presión sube demasiado.
- c) Sistemas a largo plazo, representado por el mecanismo de regulación de los líquidos (Schmidt, 1993).

La hipertensión es un estado en el cual la presión arterial está elevada por encima de un nivel específico para la edad y el sexo, como una consecuencia de algún trastorno de su sistema regulador (Smith, 1993), la presión arterial (PA) diastólica mayor de 120 mm de Hg o presión sistólica mayor de 180 mm de Hg (Aldermn,1995).

Según los expertos de la OMS, el término de hipertensión arterial designa un aumento en la presión sanguínea de las arterias que corresponden a una enfermedad de etiología múltiple y patogenia plurifactorial que se caracteriza clínicamente por la elevación de la presión arterial mínima o diastólica por encima de los 90 mm de Hg en personas de menos de 45 años, medida en condiciones basales, por la mañana, en decúbito, en ayunas y después de un reposo de diez minutos. No obstante, la cifra de la presión arterial no es constante durante toda la vida del individuo, sino que sufre ciertas variaciones fisiológicas registradas (figura 2).

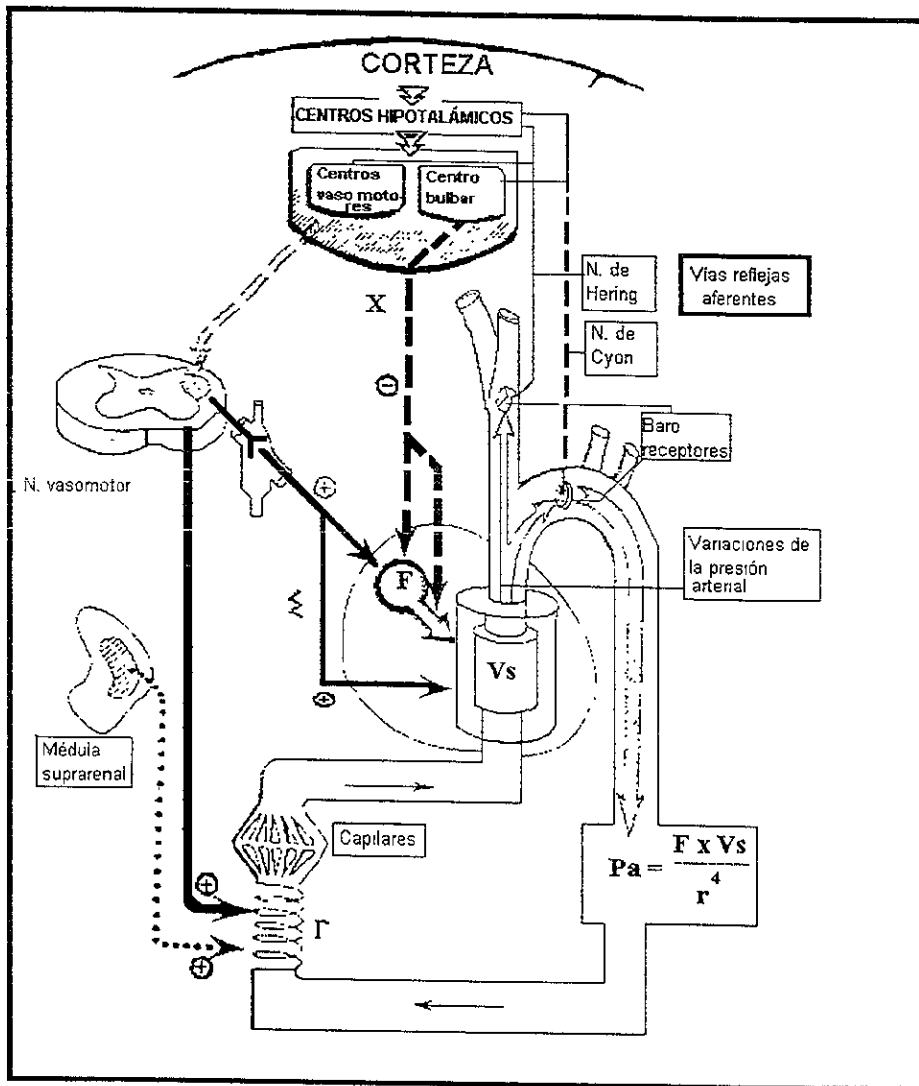


Figura 1. REGULACION DE LA PRESION ARTERIAL.

La presión arterial es regulada por los barorreceptores, nervios de Hering y Cyon, centros vasomotores bulbar e hipotalámico y las fibras simpáticas de todo el sistema vascular. Los barorreceptores, por acción sinérgica sobre el corazón y las resistencias periféricas, permiten el mantenimiento de presiones (Schmidt, 1993).

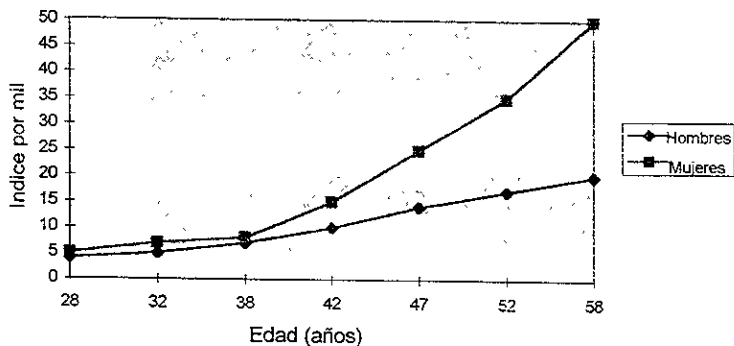


Figura 2. CIFRAS TENSIONALES NORMALES EN RELACION CON LA EDAD Y SEXO (Schmidt, 1993).

El conocimiento de la elevación de las cifras de tensión en relación con la edad es fundamental para poder interpretar cuales de ellas tienen verdaderamente significación patológica (Schmidt, 1993).

La presencia de hipertensión, sin embargo, comprende a una población de pacientes no homogénea y, en consecuencia, se han propuesto diversas clasificaciones. Una de ellas se basa en el cuadro de la presión en el transcurso del tiempo y se clasifica a los pacientes por tener hipertensión lábil o sostenida. Un segundo plan se basa en el nivel de la presión y forma subgrupos: borderline, leve, moderada, severa. Una clasificación muy importante con respecto al pronóstico y el tratamiento es la hipertensión benigna y maligna. La hipertensión maligna se caracteriza por necrosis fibrinoide de las paredes arteriales y deterioro rápidamente progresivo de la función renal, mental y visual, llegando a ser fatal (Smith, 1993).

Cuando la hipertensión puede atribuirse a una causa determinada empleamos el epíteto de hipertensión secundaria. En contraposición a esta definimos la hipertensión primaria como el aumento de presión sanguínea sin ninguna causa orgánica aparente (Schmidt, 1993). De cada 10 hipertensos, ocho

o nueve (85%) entran en la categoría que llamamos esencial o de causa desconocida, para distinguirla del tipo secundario o de causa demostrable.

En la hipertensión esencial existen 3 grupos de factores que se interaccionan para terminar dando un nivel determinado de tensión arterial:

- > Un primer tipo son los factores genéticos (genotipo), es decir, la herencia, que en la mayoría de los casos no es más que una predisposición, no un riesgo que inexorablemente deba manifestarse.
- > En segundo lugar, esta carga genética determina probablemente una reactividad excesiva, anormal, de los complejos mecanismos o sistemas de control de la tensión que además terminan siendo afectados por la hipertensión sostenida.
- > Finalmente los factores ambientales o de conducta (Saldaña, 1993).

Tabla 1 Síntomas frecuentes de la hipertensión arterial (Schmidit, 1993).

- Palpitaciones y molestias torácicas.
- Fatiga respiratoria.
- Dolor de cabeza.
- Disminución de atención.
- Nerviosismos e irritabilidad.
- Trastornos de sueño.
- Vértigos e inestabilidad.
- Falta de rendimiento.
- Zumbidos de oídos.
- Trastornos visuales.
- Alteraciones sexuales.
- Hemorragias nasales

En México, 10 millones de personas padecen de hipertensión arterial, siendo el factor de riesgo de mayor importancia para que se presenten toda una serie de enfermedades crónicas y degenerativas, los principales síntomas se

presentan en la tabla 1. La hipertensión, como enfermedad crónica silenciosa, avanza con los años hasta que, en muchos de los casos, da manifestaciones que pueden ser fatales desde el inicio; más tarde la enfermedad se aleja de las posibilidades de tratamiento o intervención para terminar con graves consecuencias. La morbilidad y mortalidad en nuestro país es creciente ya que tan solo durante el año de 1998, en el Sector Salud, los pacientes con hipertensión ocuparon el primer lugar de fallecimientos, dentro de las enfermedades cardiovasculares (INEGI, 1999).

1.1.1 CLASIFICACION DE LOS FARMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

La farmacología de agentes antihipertensivos se basa en la influencia de la presión arterial y los sitios efectores o mecanismos de acción (Tabla 2). Los medicamentos disminuyen el gasto cardíaco al inhibir la contractilidad miocárdica o reducir la presión de llenado ventricular. El decremento de esta última se logra mediante efectos sobre el tono venoso o sobre el volumen sanguíneo por medio de efectos renales. Los fármacos reducen la resistencia periférica al actuar sobre el músculo liso para generar relajación de los vasos de resistencia, o al interferir con la actividad de los sistemas que producen constricción de los vasos de resistencia (Goodman, 1997).

Por lo que la eficacia terapéutica de un medicamento no puede considerarse como prueba de una relación entre el mecanismo farmacodinámico y la etiología de la hipertensión (Honey, 1988).

La administración concurrente de fármacos de clases distintas constituye una estrategia de uso frecuente para lograr control eficaz de la presión arterial en tanto se minimizan los efectos adversos relacionados con la dosis (Goodman, 1997).

Tabla 2. Clasificación de los antihipertensivos de acuerdo a su sitio primario o mecanismo de acción (Goodman, 1997).

1. Diuréticos
Tiazidas y fármacos relacionados (hidroclotiazida, clortalidona y otros)
Diuréticos de asa (furosemida, bumetanida, ácido etacrínico)
Diuréticos ahorradores de K⁺ (amilorida, triamtereno)
2. Simpaticolíticos
Fármacos de acción central (metildopa, clonidina)
Bloqueadores ganglionares (trimetafán)
Bloqueadores de neuronas adrenérgicas
Antagonistas β-adrenérgicos (propranolol, metoprolol)
Antagonistas α-adrenérgicos (prazosin, terazosin)
Antagonistas adrenérgicos mixtos (labetalol)
3. Vasodilatadores
Arteriales (hidralizina, minoxidil, diazóxido)
Arteriales venosos (nitroprusiato)
4. Bloqueadores de los canales de calcio
(verapamil, diltiazem, nifedipino, felodipina, nifedipina, irradipina, amlodipina)
5. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
(captopril, enalapril, lisinopril, quinapril, remipril, fosinopril)
6. Antagonistas de los receptores de angiotensina II
(losartán).

1.2 CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio (Ca²⁺) son estructuras que forman poros funcionales en la membrana plasmática. Los diferentes tipos de canales de Ca²⁺ se caracterizan por sus mecanismos de apertura y cierre. Algunos canales de Ca²⁺ son dependientes del voltaje y abren en respuesta a una despolarización de membrana. Existen subclases de esta categoría de canales de Ca²⁺ que difieren en la sensibilidad de voltaje, propiedades cinéticas y sensibilidad farmacológica (Hosey, 1988).

1.2.1. ESTRUCTURA MOLECULAR

Los canales de calcio (Ca^{2+}) forman complejos heteroligoméricos, generalmente constan de subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ - δ , γ y β como lo indica la siguiente figura (Snutch, 1997).

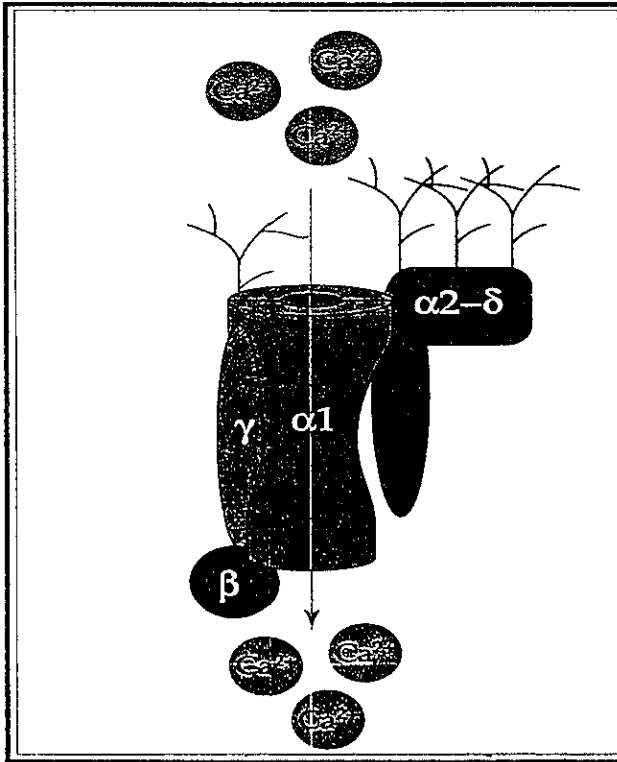


Figura 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES DE CALCIO (Snutch, 1997)

La subunidad $\alpha 1$ forma un poro, que pertenece a una familia heterogénea, existen 6 diferentes subunidades de $\alpha 1$ que pueden ser clonadas (α_{1S} , α_{1A} , α_{1B} ,

α_{1C} , α_{1D} , α_{1E}) de una longitud de 1610-2424 aminoácidos (Figura 4.) (Alexander, 1997).

La subunidad α_1 tiene sitios para antagonistas de Ca^{2+} (figura 5), sitios dependientes de la fosforilación, y dominios largos hidrofóbicos (Wray, 1989). Cada subunidad α_1 consta de 4 dominios homólogos (I-IV) que contienen de 6 a 8 regiones transmembranales. La subunidad α_1 contiene el poro (SS1-SS2) y un sensor de voltaje (S4) (Suntch, 1997), el cual contiene cargas positivas altamente conservadas (Alexander, 1997) y es el blanco de agentes farmacológicos (Suntch, 1997).

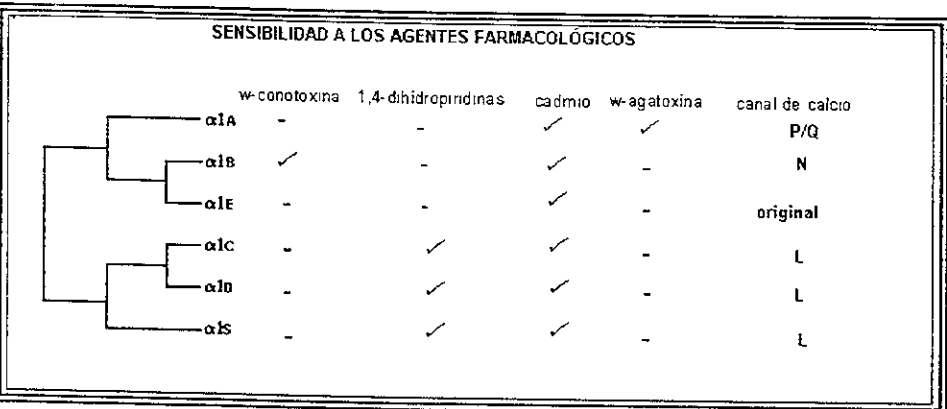


Figura 4. ARBOL FILOGENETICO DE LA SUBUNIDAD α_1 (Suntch, 1997).

La subunidad β esta asociada con una alta afinidad a la subunidad α_1 , es una región conservada en el citoplasma ligada entre los dominios I y II (Suntch, 1997), tiene sitios para la glicosilación (Wray, 1989). Las múltiples isoformas de la subunidad β que existen (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) son polipéptidos de 477-632, además existen 3 formas alternativas de β_1 (β_{1a} , β_{1b} , β_{1c}). La subunidad β carece de potencial (Alexander, 1997), juega un papel importante en la modulación de la

activación de canales de calcio por la proteína cinasa A, proteína C e interacción directa de la proteína G (Suntch, 1997). La subunidad β y $\alpha 1$ contribuyen al cambio de voltaje dependiente de la activación e inactivación del canal modificando la afinidad del ligando (Alexander, 1997).

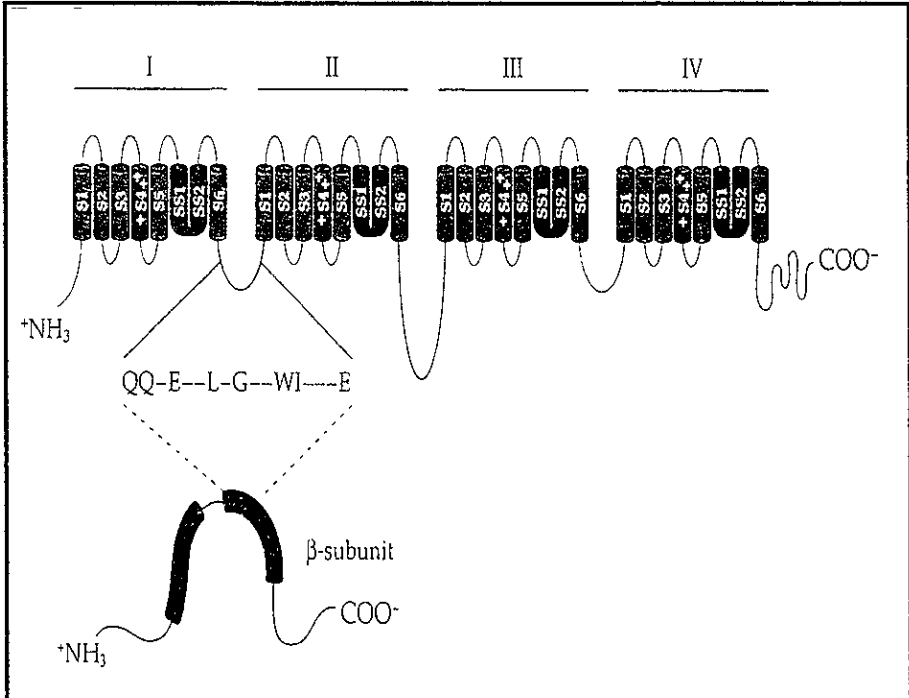


Figura 5. TOPOLOGIA DE LA SUBUNIDAD $\alpha 1$.

Topología membranar de la subunidad $\alpha 1$ y el sitio de interacción con la subunidad β en el canal de calcio (Suntch, 1997)

La subunidad $\alpha 2$ esta ligada por puentes disulfuro a la membrana de la subunidad δ , además poseen 2 y 1 dominio transmembranar respectivamente (Alexander, 1997).

La subunidad γ de 30 Kda interacciona independientemente con α_1 , contiene un segmento transmembranal y consta de aproximadamente el 30% de carbohidratos (Wray, 1989), contiene 22 aminoácidos y tiene 4 regiones transmembranales (Alexander, 1997).

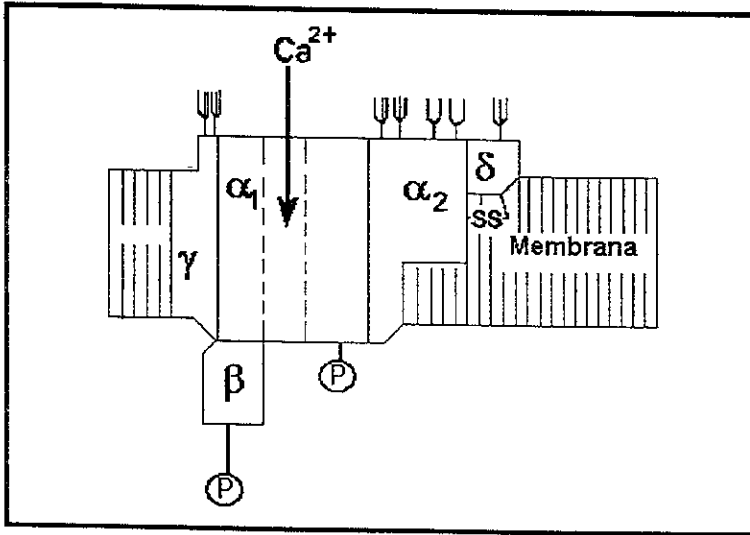


Figura 6. MODELO ESTRUCTURAL PARA EL CANAL DE CALCIO.

Modelo propuesto para la estructura del canal de calcio. Sitios de fosforilación (P) dependientes de AMPc, y con interacción de la membrana (Herbette, 1992)

Los canales de calcio de Ca^{2+} son clasificados por sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas en tipo L,N,P,Q y T. Los canales tipo T tienen actividad transitoria en potenciales relativamente negativos (-70 a -40 mV). La actividad de los canales L,N, P y Q es a potenciales positivos y son dependientes del voltaje (Suntch, 1997).

1.2.1.1 CANALES DE CALCIO TIPO L

Los análisis bioquímicos muestran que los canales de Ca^{2+} tipo L son complejos heterologoméricos y constan de las subunidades $\alpha 1, \alpha 2, \delta, \beta$ y γ (figura 6) (Suntch, 1997).

Los canales de Ca^{2+} tipo L de corazón difieren de los del músculo esquelético en sus propiedades electrofisiológicas, farmacológicas e inmunológicas, estos canales de Ca^{2+} pueden ser purificados usando derivados de las 1,4-dihidropiridinas (Yoshida, 1990), dado que el receptor de las dihidropiridinas esta asociado con los canales de Ca^{2+} tipo L (Murphy, 1989), los sitios de unión de Ca^{2+} están vinculados en el segmento S2 del receptor de las dihidropiridinas (Furuichi, 1989). A través de análisis electroforéticos y etiquetando componentes purificados por afinidad se revelaron la presencia de 3 glicoproteínas de masa molecular de 170 ± 13 , 110 ± 25 , y 60 ± 17 kd, estas glicoproteínas son los sitios receptores de los canales de Ca^{2+} tipo L, en músculo y células excitables (Dupuis, 1993).

1.2.2 FUNCION

La función de los canales de Ca^{2+} es la regulación del flujo de Ca^{2+} dentro de la célula (Gelfand, 1986). El Ca^{2+} es un componente esencial de la transducción de señales en los linfocitos cuando son estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (Dupuis, 1993). LA PHA se une a sitios receptores específicos ligando proteínas involucradas en el procesamiento de activación del linfocito (Dupuis, 1981), para incrementar la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de interleucina 2 (IL-2) (Gelfand, 1986), la cual es secretada predominantemente por células T helper CD^{4+} (Gelfand, 1988).

El $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el primer mensajero en la mitogénesis de los linfocitos T estimulados por PHA (Tsien, 1982), induce una señal que aumenta el movimiento de

fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato con la producción del D-myo-inositol-1,4,5-trifosfato (InP_3) (Dupuis, 1993).

El InP_3 es un segundo mensajero con regulación intracelular de Ca^{2+} (Berridge, 1989), a través de la movilización interna de almacenes de Ca^{2+} (figura No. 7), además puede actuar en combinación con el canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática de los linfocitos T (Kuno, 1987), dado que tiene un papel en la liberación de Ca^{2+} desde sitios intracelulares tales como el retículo endoplásmico, esto es probablemente a que la proteína P_{400} tiene afinidad para Ca^{2+} y esta proteína es el sitio receptor para el InP_3 (Furuichi, 1989). La movilización de Ca^{2+} por InP_3 aparentemente es el principal mecanismo (Challiss, 1996).

El Ca^{2+} estimula a la proteína cinasa C (PKC), para incrementar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que es esencial para la activación de una segunda señal que es provista por interleucina 1 (IL-1) (Dupuis, 1993) Las dos señales conducen a la fosforilación para la síntesis de ADN (Berridge, 1985).

La proliferación de las células T en respuesta a la PHA involucra la producción y respuesta a la linfocina interleucina 2 (IL-2) (Gelfand, 1988), la cual se adhiere a 2 receptores moleculares distintos, el receptor de la cadena α (IL-2R α , 70-75p) y el receptor de la cadena β IL-2R β , 55p) (Hatakeyama, 1989), además a una tercera subunidad γ necesaria para formación de receptores de alta e intermedia afinidad (Takeshita, 1992).

El receptor de IL-2 (IL-2R) es presentado en 3 formas: alta, intermedia y baja afinidad con respecto a la habilidad de unirse a IL-2 y su constante de disociación (k_s 's), las cuales son de 10^{-11}M (α, β, γ), 10^{-9}M (β, γ) y 10^{-8}M (α) (Hatakeyama, 1989). Este receptor es suprimido por fármacos bloqueadores de los canales de Ca^{2+} , bloqueando el flujo normal requerido de Ca^{2+} para la activación de linfocitos y por lo tanto inhibe la proliferación del linfocito (Birx, 1984). En un subjuego la PHA conduce a la expresión del receptor de IL-2R

en ausencia de Ca^{2+} extracelular, obligando a la célula que exprese el receptor de IL-2, entonces la célula puede proliferar. La proliferación de células T requiere de

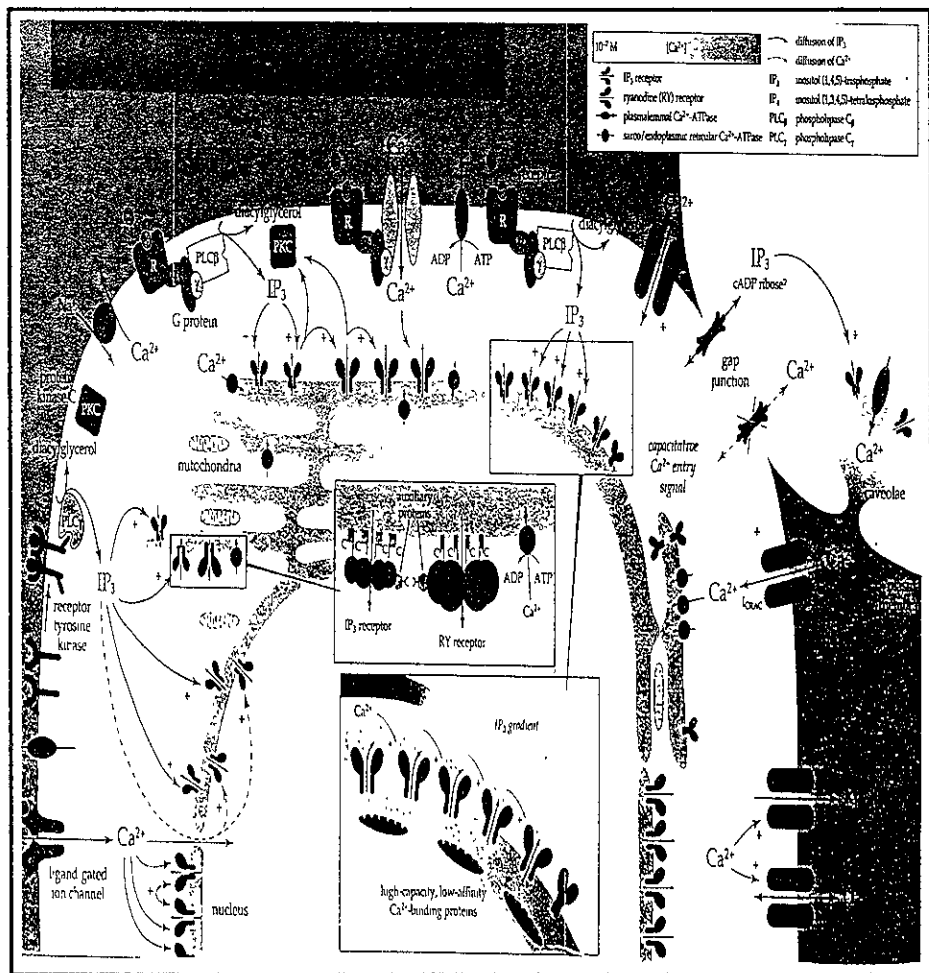


Figura 7. CALCIO INTRACELULAR

El calcio es importante en la señalización para la activación de receptores. La movilización del almacén de calcio por IP_3 es el principal mecanismo, el agotamiento del almacén de calcio activa a la membrana plasmática para llenar el almacén, activando IP_3 , InP_4 , nucleótidos cíclicos, GTPasas y factor de flujo de calcio (Challis, 1996)

la interacción con el receptor de IL-2 o bien de la inducción de la expresión de IL-2R (Gelfand, 1986).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTAGONISTAS DE CALCIO

Los agentes terapéuticos se introducen buscando una acción en base a una actividad supuesta, y el tiempo revela otras actividades y un mecanismo de acción diferente. Este es el caso de los antagonistas de calcio (AC), cuya evolución hemos tenido en los últimos años (Salva, 1987).

Los AC constituyen un grupo heterogéneo de agentes que tienen en común la capacidad de inhibir el movimiento de los iones Ca^{2+} a través de las membranas celulares (Cohn, 1997).

Debido a que interfieren con los flujos de Ca^{2+} disminuyendo la disponibilidad de Ca^{2+} citoplasmático para los fenómenos de contracción, tono o excitabilidad celular, inhibiendo los mecanismos que hacen disponible el Ca^{2+} (Figura 8). Dependiendo de su mecanismo de acción e incluso de circunstancias farmacodinámicas, los AC poseen cierta selectividad, lo que influye evidentemente en sus indicaciones terapéuticas (Salva, 1987).

Los AC difieren ampliamente en sus efectos farmacológicos específicos sobre la contracción del miocardio y del músculo liso de los vasos sanguíneos, la formación y conducción del impulso cardiaco y la selectividad vascular. Por consiguiente, los efectos clínicos de un AC dependen de su efecto sobre la contractilidad y la conducción, así como de las respuestas fisiológicas reflejas y el estado del sistema cardiovascular del paciente.

Los AC disponibles en la actualidad representan a tres clases químicas distintas relacionadas con tres tipos de receptores en el canal del calcio:

- ① Difenilalquilaminas, o fármacos parecidos al verapamil.
- ② Benzotiazepinas, o fármacos parecidos al diltiazem.
- ③ Dihidropiridinas, incluyendo al nifedipino, la nisoldipina, la nicardipina.

La farmacocinética y las propiedades de absorción de cada uno de estos agentes son también importantes, sobre todo en los fármacos de la clase de las dihidropiridinas,. El inicio de su acción y la duración de su efecto afectan de manera considerable la respuesta general hacia el fármaco. Los fármacos de acción más prolongada, que son muy utilizados , poseen una farmacocinética intrínseca retardada o han sido fabricados con una forma de dosificación que retarda su absorción (Cohn, 1997).

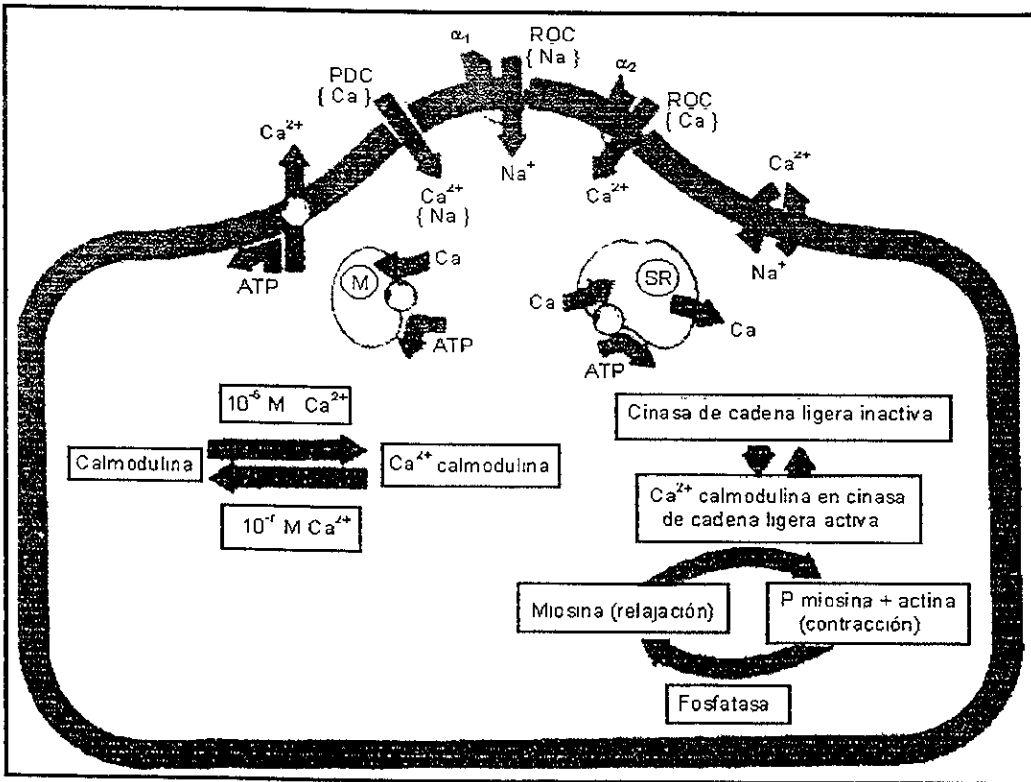


Figura 8. REPRESENTACION DE LOS MOVIMIENTOS DE CALCIO EN LA FIBRA LISA .

La entrada de calcio puede hacerse a través de canales operados por el potencial de acción (potencial dependiente canal PDC) u operados por receptores (ROC). En la fibra lisa el tono depende esencialmente de la entrada de calcio exterior y la eliminación por intercambio de sodio-calcio o por la bomba de calmodulina. (Salva 1987).

1.3.1 DIHIDROPIRIDINAS

Las dihidropiridinas actúan sobre todo en las células musculares que dependen del flujo externo-interno de Ca^{2+} y por ello poseen acción vasodilatadora y actividad sobre la conducción y contractibilidad cardiacas (Salva, 1987).

Con base en sus efectos sobre la contractilidad cardiaca, las dihidropiridinas se dividen en tres subclases:

- ① Los inotrópicos negativos como nifedipino , y en menor grado, la nisoldipina, disminuyen la fuerza de la contracción y son vasodilatadores potentes.
- ② Es probable que la amlodipina y la felodipina no disminuyan la contractilidad.
- ③ Los fármacos restantes suelen ser neutros en cuanto a la frecuencia cardiaca y a la contractilidad (Cohn,1997).

En particular, el nifedipino es un vasodilatador periférico muy potente, pero no produce efectos sobre la conducción cardiaca. Sin embargo, la preparación de liberación inmediata es capaz de evocar una respuesta de catecolaminas en los pacientes hipertensos, produciendo cierta taquicardia refleja como resultado de una vasodilatación periférica potente. Este efecto tiende a contrarrestar el efecto inotrópico negativo del fármaco a menos que ya exista insuficiencia cardiaca por disfunción sistólica con una fracción baja. En esa situación, puede ocurrir un efecto inotrópico negativo manifestado por empeoramiento de la insuficiencia cardiaca. Parece ser que el uso crónico de los fármacos de acción prolongada no aumenta la actividad del sistema simpático (Cohn,1997).

Todas las dihidropiridinas son vasodilatadores periféricos importantes, pero la nisoldipina, el nifedipino y la felodipina son los más potentes.

También parece ser que las dihidropiridinas ejercen algunos efectos antiplaquetarios tal vez debido a la inhibición del transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plaquetaria. Se ha demostrado que los AC, solos o combinados con el ácido acetilsalicílico, inhiben el funcionamiento de las plaquetas, pero no se sabe

cuál es el significado de este efecto. Unos cuantos estudios clínicos muestran una disminución moderada, pero significativa, en la agregación plaquetaria y un incremento en el tiempo de sangrado en algunos pacientes que toman antagonistas de Ca^{2+} , más no se considera que la actividad antiplaquetaria sea una característica prominente de las dihidropiridinas. Es poco probable que los riesgos o los beneficios sobrepasen a los del ácido acetilsalicílico, el cual sigue siendo el fármaco antiplaquetario de elección en los pacientes que padecen cardiopatía isquémica (Cohn, 1997).

1.3.1.1 ANTECEDENTES

El más importante sistema de anillos de seis miembros es la piridina, que puede ser derivada teóricamente del benceno por reemplazamiento de un átomo de carbono e hidrógeno por un nitrógeno. La piridina fue descubierta por Ardenon en 1899 y la aisló en estado puro del aceite del polvo de los huesos. La piridina es un compuesto aromático muy parecido al benceno en su estructura, la asimetría del anillo incrementa mucho al número de isómeros estructurales posibles a comparación del benceno. De los métodos más convenientes conocidos para la síntesis de piridinas sustituidas están los sintéticos, entre los cuales se halla la síntesis de Hantzsch, reacción que involucra la condensación de un aldehído apropiado con β -cetoéster en presencia de una fuente de amoníaco, para inicialmente obtener una dihidropiridina, que posteriormente es oxidada a la piridina sustituida correspondiente (Paquette, 1992).

A partir de la síntesis de Hantzsch (figura 9) se obtuvo el compuesto 1,4-fenilmetoxi-dihidropiridina (DPH-4) (figura 10), el cual fue caracterizado por métodos espectroscópicos como: Resonancia Magnética Nuclear Protónica, Carbono 13, Espectroscopia de Masas y Ultravioleta. La modificación de dicho compuesto fue realizada en la posición 4 de la molécula base. El estudio conformacional se realizó auxiliado por el uso de la Supercomputadora CRAY YMP 4/4 32 con los programas especializados en diseño molecular como

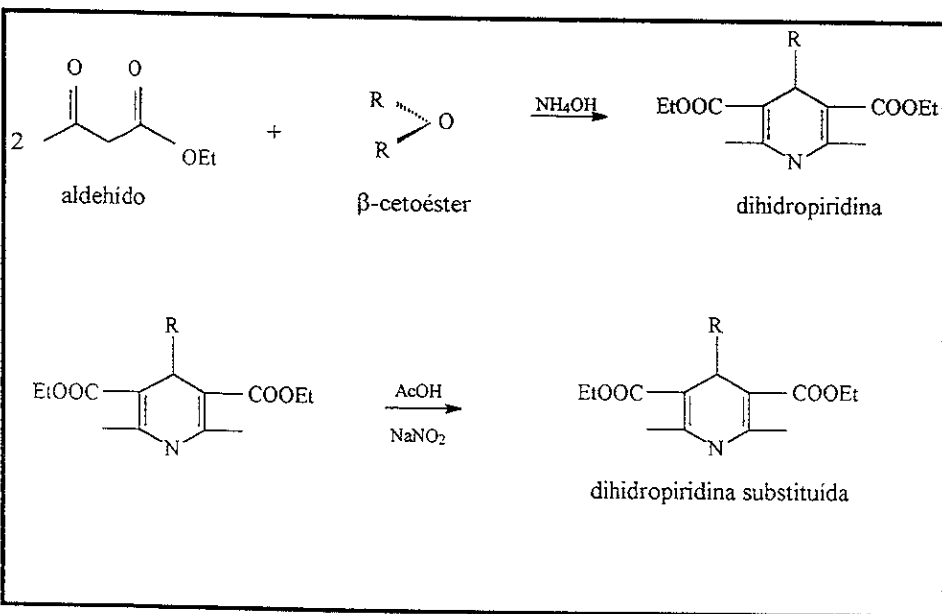


Figura 9. SINTESIS DE HANTSZCH

Reacción para la obtención de las 1,4-dihidropiridinas polisustituidas (Paquette, 1992).

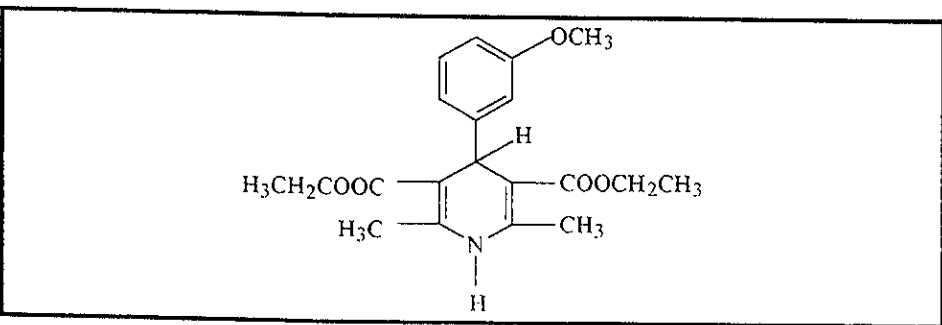


Figura 10. ESTRUCTURA DE DHP-4

1,4-Fenilmetoxi-dihidropiridina, obtenida en el Laboratorio de Química Orgánica de la FESC-1 por el grupo del M en C. Enrique Angeles.

1.4 TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSION CON ANTAGONISTAS DE CALCIO

Por ser la hipertensión arterial una enfermedad crónica, se deben considerar dos hechos importantes en la elección de un medicamento. En primer lugar, elegir fármacos que se pueden utilizar en una sola toma diaria y, en segundo lugar, que esa toma no eleve la dosis, pues aunque prolonga el efecto del fármaco, puede conducir a periodos de hipoperfusión de órganos vitales al momento del efecto máximo. Compatibilizar estos dos aspectos ha hecho que se introduzca el concepto relación “trough to peak”, es decir la relación entre el efecto residual del fármaco al momento de la siguiente toma y el efecto máximo de éste (Stockins, 1995).

El concepto “trough to peak” ha cobrado tal importancia que el Comité de Drogas Cardiovasculares y Renales de la FDA, ha recomendado que los fármacos antihipertensivos deben tener una relación “trough to peak” de por lo menos 50 a 60%, lo que quiere decir, que al momento de recibir la siguiente dosis del medicamento su efecto debe ser de por lo menos, 50% del efecto máximo (Meredith, 1995).

La utilización de los AC en el tratamiento de la hipertensión aparece posteriormente a su empleo como antianginosos y deriva de las observaciones clínicas de su efecto favorable en pacientes hipertensos. Cuando se vió que los AC eran más eficaces como relajadores arteriolas que venosos, se sugirió su posible utilidad como medicamentos antihipertensivos específicos, iniciándose ensayos clínicos que en pocos años han conducido a estos fármacos a ocupar un lugar definido en el tratamiento habitual de la hipertensión (Salva, 1987).

Los antagonistas más utilizados en el tratamiento de la hipertensión esencial son los siguientes: amlodipina, verapamil por vía oral, ditiacem de liberación prologada, isradipina, nifedipino de liberación prolongada, felodipina y nisoldipina (tabla 3) (Cohn,1997).

TABLA 3 ANTAGONISTAS DE CALCIO EN LA PRACTICA CLINICA. (Cohn, 1997)

Angina, crónica estable

Amlodipina, bepridil, diltiacem, diltiacem LP, nicardipina, nifedipino, nifedipino LP, verapamil, verapamil LP.

Angina inestable

Verapamil

Angina vasoespástica

Amlodipina, nifedipino, nifedipino LP, verapamil

Fibrilación auricular/flutter auricular

Diltiacem I.V., verapamil, verapamil I.V.

Hemorragia subaracnoidea por ruptura de un aneurisma congénito

Nimodipina

Hipertensión, esencial

Amlodipina, diltiacem LP, diltiacem LS, felodipina, isradipina, nicardipina, nicardipina LS, nicardipina I.V., nifedipina LP, nisoldipina, verapamil LP, verapamil LS.

Taquicardia supraventricular paroxística

Diltiacem I.V., verapamil LP.

Taquicardia supraventricular repetitiva (sólo profilaxis)

Verapamil.

No obstante, los AC disminuyen la presión arterial de manera muy eficaz, producen pocos efectos colaterales o efectos metabólicos adversos y suelen ser bien tolerados. Estas características los vuelven populares aún para los pacientes que no padecen otras enfermedades además de la hipertensión. Según el Quinto

Informe del Comité Nacional Conjunto sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, los AC favorecen la eliminación de sodio . Por tanto, no es necesario combinarlos con un diurético como tratamiento de primera o de segunda línea. Debido a que los AC producen pocos efectos metabólicos, a menudo constituyen una buena alternativa para los pacientes que padecen otras enfermedades (Joint, 1993).

En la declaración de 1994 el grupo de trabajo del Programa Nacional de los Estados Unidos de Norteamérica de Educación sobre Hipertensión Arterial, señala a los AC entre las clases de agentes preferidos para los pacientes que padecen hipertensión y diabetes. Los AC, del mismo modo que los inhibidores de la ECA no afectan de manera adversa las concentraciones de lípidos ni empeoran la tolerancia a la glucosa. Estos factores contribuyen a que los AC sean una alternativa razonable en pacientes diabéticos e hipertensos o cuando el tratamiento con un inhibidor de la ECA no surte efecto o no es tolerado (Conh, 1997).

Los AC han reducido la velocidad de declinación del funcionamiento renal en pacientes que padecen hipertensión e insuficiencia renal crónica a través de mecanismos que aparentemente son independientes de sus efectos sobre la presión arterial (Brazy, 1990). También es posible que el tratamiento antihipertensivo con AC retarde el avance de las complicaciones renales en las personas diabéticas (Fatourechi, 1996). A diferencia de los diuréticos y los β -bloqueadores , los AC dilatan la arteriola eferente y mejoran la perfusión renal (Cohn, 1997).

Los AC son bien tolerados, y pueden combinarse con β -bloqueadores, inhibidores de la ECA y diuréticos, los cuales probablemente producen efectos adicionales para mejorar al máximo el control de la presión arterial (figura 11). Los individuos idóneos para ello son los pacientes que han recibido mal la monoterapia a dosis apropiadas, pero las combinaciones de dosis bajas están

ganado terreno como un tratamiento en primera línea potencialmente útil (Neaton, 1993).

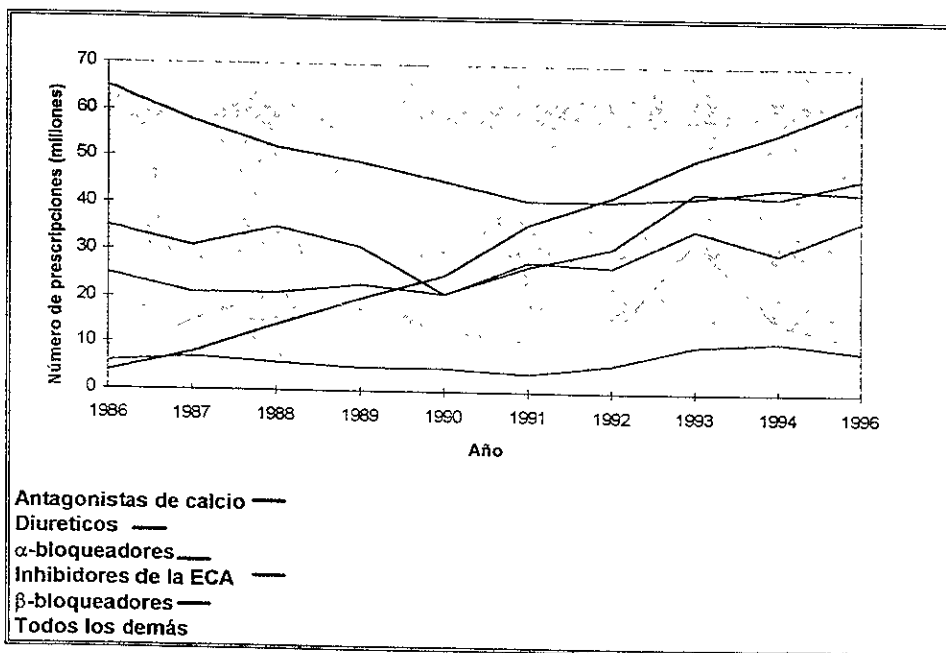


Figura 11. LAS PRESCRIPCIONES DE LOS ANTAGONISTAS DE CALCIO.

Aumentaron de manera considerable entre 1986 y 1996, y ahora constituyen la clase de fármacos que se prescribe más a menudo para el tratamiento de la hipertensión (Cohn, 1997)

Los AC de acción prolongada y los sistemas de administración una vez al día son más seguros y eficaces que otras preparaciones. Puesto que estos compuestos tienden a producir pocos efectos colaterales y su uso es más conveniente, los pacientes se apegan mejor al tratamiento. Un método novedoso es la elaboración de fármacos cuyo efecto máximo ocurre en las primeras horas de la mañana, calculado para que coincida con los incrementos en la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el tono del sistema simpático que ocurren en las primeras horas de la mañana (Cohn, 1997).

Se están realizando varios estudios de gran tamaño sobre resultados finales, y se espera que éstos resuelvan algunos de los aspectos más amplios que rodean al tratamiento antihipertensivo. El estudio de mayor tamaño es el llamado Estudio sobre Tratamiento Antihipertensivo y Reductor del Colesterol para Prevenir el Infarto Agudo al Miocardio (ALLHAT), el cual proporcionará la información más autorizada y útil desde el punto de vista clínico de todos los estudios en los que se está investigando actualmente la seguridad y la eficacia a largo plazo de los AC. El objetivo principal del ALLHAT es determinar si los fármacos más antiguos son capaces de reducir la incidencia y el avance de la cardiopatía isquémica; se espera que los resultados estén listos en el año 2002 (Davis, 1996).

Las nuevas dihidropiridinas, que se están elaborando muestran una selectividad vascular mayor y menos efectos de depresión cardíaca, características que pueden mejorar el perfil de efectos colaterales y aumentar su aplicación clínica. Las dihidropiridinas se utilizan ampliamente en las personas que padecen la enfermedad de Raynaud por que son vasodilatadores periféricos potentes. La información disponible indica que producen beneficios, por lo menos en algunos pacientes. Se considera que las dihidropiridinas más útiles son el nifedipino y la felodipina (Cohn, 1997).

Los tratamiento de la hipertensión arterial que tienen impacto sobre el daño del órgano distal, incluyen el nivel de la presión y su duración, la carga de la presión, la reducción de la circulación, el ciclo cardíaco y probablemente la variabilidad de la presión durante las 24 horas. La variabilidad de la presión en 24 horas se determina por el daño en órganos blanco y el nifedipino retrasa la arterioesclerosis temprana en humanos y en modelos experimentales. El nifedipino muestra un espectro de beneficios clínicos sobre y más allá de su efecto antihipertensivo, como son la excelente relación "trough to peak", los perfiles farmacocinéticos y los hemodinámicos (Schwartz, 1995). Los datos de eficiencia sobre la relación "trough to peak" reducen significativamente la presión

sistólica y diastólica, cuyo valor para el nifedipino está por encima de 0.72 (Mancia, 1995).

El nifedipino emerge como terapia de primera línea para el tratamiento de la hipertensión y la prevención de daño a órgano blanco (Schwartz, 1995).

1.5 GENOTOXICOLOGIA

La genotoxicología es una subespecialidad de la toxicología, identifica y analiza la acción de los agentes con toxicidad dirigida hacia los componentes hereditarios de los seres vivos (Kibey, 1978). Los agentes que específicamente producen alteraciones genéticas a niveles subtóxicos de exposición son llamados genotóxicos. Las sustancias genotóxicas usualmente tienen propiedades químicas o físicas que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos (Kilbey, 1978).

La genotoxicología ha jugado un doble papel en los estudios de los efectos de la salud. Una función es la implementación de pruebas y métodos de la estimación de riesgo para definir el impacto de los agentes genotóxicos que son encontrados en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del juego genético humano. La segunda función es el descubrimiento de las relaciones entre la genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (Sasaki, 1982).

El rápido crecimiento de la industria farmacéutica, relativamente joven, ha provocado investigaciones legales y revisión periódica de las leyes de control gubernamental de la introducción, promoción y distribución de los nuevos fármacos. Dentro de las investigaciones se encuentran los estudios toxicológicos. Estos estudios forman parte de lo que se llama desarrollo de un nuevo medicamento para conocer las propiedades del fármaco y llenar los requisitos que existen en las legislaciones para que el fármaco reciba el permiso o autorización para ser prescrito (Bondani, 1982).

En el desarrollo de un fármaco, una vez que se ha sintetizado una nueva molécula o aislado un nuevo principio activo, se requiere probar los efectos de estas sustancias, los estudios que se efectúan en animales o en preparaciones “in vitro” antes de que el fármaco se aplique a un ser humano se llaman estudios de farmacología preclínica (Bondani, 1982).

1.5.1 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

Uno de los procesos inducidos por la interacción de agentes genotóxicos con las moléculas de ADN es el de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Estos como su nombre lo indica, son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (figura 12) (Morales, 1988).

Esta técnica fue desarrollada por J. Herbert Taylor utilizando autorradiografía detectando la diferenciación de cromátidas hermanas (Latt, 1979) y se ha perfeccionado logrando una valoración más objetiva del daño cromosómico (Salamanca, 1990), la cual nos ofrece un panorama de la capacidad genotóxica de diferentes sustancias (Latt, 1979).

Los sistemas de análisis de los ICH para la detección del daño genético se han utilizado tanto in vivo en diferentes tejidos de animales intactos como in vitro en cultivo celular (Morales, 1988). Las condiciones in vitro pueden contribuir inmensamente al desarrollo de la genética toxicológica (Sobels, 1987)

La sustitución de 5-BrdU dentro de las secuencias de DNA para la tinción diferencial de las cromátidas permite identificar los ciclos de replicación de las células en metafase y las variaciones que esta presente en distintas circunstancias ambientales incluyendo la presencia de algunas sustancias químicas. Este hecho debe tomarse en consideración al utilizar a los ICH como indicador de mutagenicidad, ya que los cambios en la duración del ciclo celular puede alterar la frecuencia del ICH (Salamanca, 1990).

Los inductores potentes son aquellos que inducen una frecuencia del ICH cinco veces mayor el valor considerado como normal o basal del control, los menos potentes inducirían solo el doble pero resultan significativos cuando se comparan con los valores normales (Salamanca, 1990).

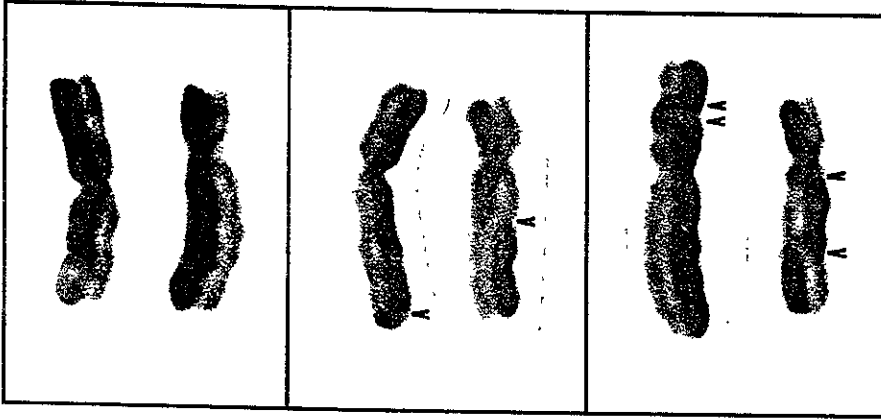


Figura 12. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS.

Representación de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) sencillo, dobles y triples en un cromosoma del tipo de los que se presentan en las células de humano (Verma, 1995).

1.5.2 MECANISMO

El ICH en células somáticas puede mostrarse por diferenciación de manchas en cada cromátida de cromosomas mitóticos. Esto se logra por incorporación de un análogo de timidina, la 5-bromodeoxiuridina (BrdU), dentro del DNA replicado para dos ciclos celulares sucesivos y subsecuentemente unidos a la fotodegradación utilizando fluorocromos, Hoechst 33258 y Giemsa (Verma, 1995).

Para obtener ICH, la incorporación asimétrica de BrdU en el DNA cromosomal es esencial. La asimetría puede ser una cromátida bisustituída incorporada de BrdU (ejemplo: células creciendo consecutivamente por dos

ciclos celulares en presencia de BrdU) o una cromátida conteniendo un solo filamento sustituido con BrdU y la otra conteniendo DNA no sustituido (por ejemplo células creciendo en presencia de BrdU por un ciclo celular y subsecuentemente creciendo para otro ciclo celular sin BrdU) (figura 13).

Se han sugerido dos mecanismos básicos para la tinción de ICH : (1) los procedimientos usados para la tinción diferencial causan una mayor pérdida de DNA de la cromátida bisustituída que su contra parte y la intensidad de tinción es proporcional a la cantidad de DNA remanente en la cromátide y (2) la alteración en las proteínas cromosomales, por la incorporación de BrdU dentro del DNA cambia de alguna manera el enlace para que en la tinción con Giemsa los cromosomas resulten con una tinción diferencial (Verma, 1995).

Los ICH se utilizan para determinar el potencial mutagénico de nuevos compuestos químicos comparando la frecuencia de ICH inducidos por el agente, además de que es un parámetro que provee importante información con relación a los efectos citogenéticos de mutagénesis. La diferenciación de cromátidas hermanas se utiliza efectivamente en estudios de cinética celular, por ejemplo, determinando la duración del ciclo celular (Verma, 1995).

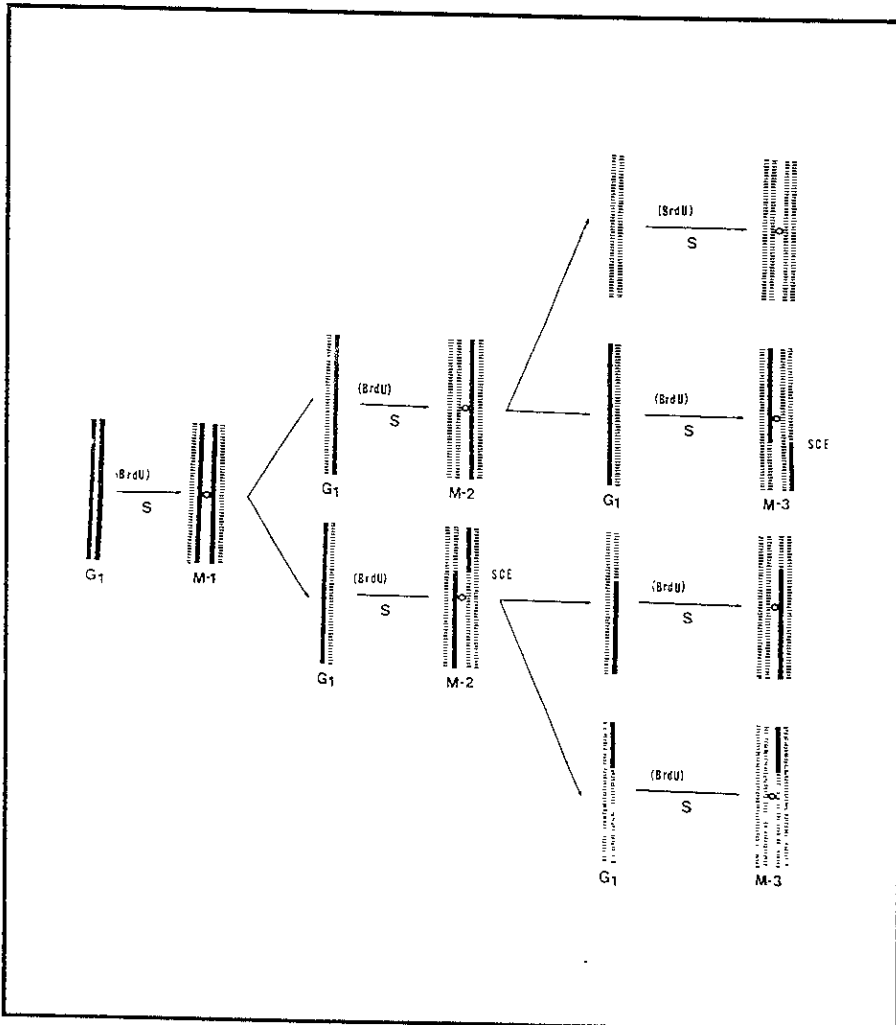


Figura 13. ILUSTRACION DIAGRAMATICA DEL MECANISMO DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS.

Las barras sólidas indican la hebra original de DNA, mientras que las barras sombreadas con líneas indican la incorporación de BrdU en la hebra de DNA (Verma, 1995)

II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS

Si las 1,4-dihidropiridinas aumentan el número de intercambios de cromátidas hermanas entonces se habrá puesto de manifiesto su potencial genotóxico.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

⇒ Determinar la actividad genotóxica de las 1,4-dihidropiridinas (nifedipino y DHP-4) a diferentes concentraciones, mediante la evaluación del incremento de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos y el estudio de la cinética celular.

2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, producidos por las 1,4-dihidropiridinas en cultivo de linfocitos humanos a diferentes concentraciones.

2. Valorar el efecto in vitro que las 1,4-dihidropiridinas, tienen sobre la cinética de división de los linfocitos a diferentes concentraciones, utilizando como parámetros el índice mitótico y la cinética de proliferación celular.

3. Establecer las semejanzas o diferencias genotóxicas provocadas por las 1,4-dihidropiridinas estudiadas.

III. METODO

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

➤ Se utilizaron 15 mL de sangre venosa asépticamente tomada con heparina y se obtuvo de una donadora de 26 años de edad, clínicamente sana que no fumó ni tomó medicamentos 15 días previos a la toma de muestra.

3.2 MATERIAL Y EQUIPO

Botellas para cultivo celular estériles desechables de 25 cm²

Pipetas serológicas estériles desechables de 10 mL

Pipetas serológicas estériles desechables de 5 mL

Puntas para micropipeta desechables

Frascos viales ámbar estériles de 10 mL

Filtros millipore

Membranas Millipore de poro de 0.22μ.

Jeringa estéril de 20 mL.

Portaobjetos.

Vasos coppling.

Microscopio óptico.

Campana de flujo laminar.

Cámara de luz negra.

Tubos de centrifuga de punta V.

Centrifuga clínica.

Agitador vórtex.

Estufa a 37°C.

3.3 REACTIVOS

NIFEDIPINO 0.0798 M.

DIHIDRIPYRIDINA (DHP- 4) 0.0798M.

Acido acético.

Fitohemaglutinina

Cloruro de potasio

Bis-Benzimidazol (Hoechst 33258).

Solución salina de citratos (2XSSC).

Etanol.

Dimetilsulfóxido (DMSO).

Giemsa.

Buffer de fosfatos-citratos pH= 7.

Agua destilada.

5-Bromodeoxiuridina (5-BrdU) 18 μ M.

Xilol.

Medio de cultivo McCoy 5a (modificado) con L-glutamina y bicarbonato de sodio.

Mezcla de antibiótico (penicilina-estreptomina).

Colchicina.

3.4 PROCEDIMIENTO

1.- Se realizaron los cálculos para la preparación de soluciones de nifedipino y DHP- 4 de acuerdo con las concentraciones plasmáticas y séricas máximas alcanzadas después de 30-60 minutos de la administración según bibliografía (PLM,1996). Se determinaron 4 concentraciones las cuales correspondieron a 0.08, 0.4, 0.8, y 1.2 μ g/mL, tanto para nifedipino como para DHP-4. Todos disueltos en una solución de DMSO-etanol 3%.

2.- Se esterilizaron los siguientes reactivos por filtración :

5-BrdU 18 μ M.

Nifedipino 0.0798 M.

DHP-4 0.0798 M.

Fitohemaglutinina.

Mezcla de antibiótico.

Colchicina 0.04%.

A) CULTIVO DE LINFOCITOS :

3.- Se adicionó a cada frasco de cultivo estéril los siguientes reactivos:

8.0 mL de medio de cultivo McCoy 5a (modificado) con L-glutamina.

1 0 mL de sangre entera.

0.3 mL de fitohemaglutinina.

0.1 mL de antibiótico.

4.- Posteriormente se mezcló el contenido de los frascos y se incubó en la estufa a 37°C durante 24 horas.

5.- A las 24 horas de incubación se procedió a enumerar y adicionar 45 μ L de 5-BrdU y las siguientes sustancias como lo indica el cuadro:

| Compuesto | Concentración μ g/mL | Volumen (μ L) |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| DMSO-agua 3% | 0 | 45 |
| Nifedipino | 0.08 | 1 |
| DHP-4 | 0.08 | 1 |
| Nifedipino | 0.4 | 5 |
| DHP-4 | 0.4 | 5 |
| Nifedipino | 0.8 | 10 |
| DHP-4 | 0.8 | 10 |
| Nifedipino | 1.2 | 15 |
| DHP-4 | 1.2 | 15 |

todas las concentraciones se realizaron por duplicado.

6.- Se mezcló bien el contenido de los frascos y se incubó dentro de la estufa por 46 horas más a 37°C.

7.- Al término de las 70 horas se agregó a cada frasco de cultivo una gota de colchicina al 0.04% y continuamos con la incubación hasta completar las 72 horas.

B) COSECHA DE LINFOCITOS.

- 1.- Una vez completado el período de incubación, se sacaron los frascos de la estufa y se transfirió su contenido a tubos de punta "V" cónicos, y se centrifugaron a 3000 r.p.m./10 minutos.
- 2.- Se retiró el sobrenadante y se adicionó 8 mL de KCl 0.075M y se incubó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 3000 r.p.m./10 minutos, y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular con ayuda del vórtex.
- 3.- Con agitación constante se agregó lentamente 8 mL de solución fijadora (etanol/ácido acético 3:1) frío.
- 4.- Se dejó actuar la solución fijadora por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se repitió el tiempo de fijación dos veces a tiempos de 15 minutos cada uno.
- 6.- Después de la tercera fijación se centrifugó y se dejó un poco de solución fijadora para hacer una suspensión celular adecuada.
- 7.- Se resuspendió el paquete celular y se dejó caer tres gotas de ésta suspensión sobre un portaobjetos limpio y frío desde una altura de 20 cm. aproximadamente.
- 8.- Las laminillas se secaron al aire.
- 9.- Se maduraron las laminillas 24 horas.

C) TINCIÓN DIFERENCIAL PARA INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH).

- 1.- Se preparó la solución stock de Hoechst a una concentración 0.025 g/10 mL.
- 2.- Se tomó 1 mL de la solución stock y se agregó 9 mL de agua destilada y 10 mL de buffer diferencial (solución de trabajo) :
- 3.- Se colocaron 6 gotas de solución de trabajo sobre la laminilla, se montó el cubreobjetos sin formar burbujas y se metió a obscuridad por 20 minutos.

4.- Se adicionó solución buffer diferencial al portaobjetos cuidando de no mover el cubreobjetos a manera de crear una cámara húmeda.

5.- Se sometió a luz negra 1 hora a una distancia de 1 cm entre la laminilla y la lámpara.

6.- El cubreobjetos se retiró por inmersión.

7.- Se sumergieron en 2XSSC 15 minutos 60°C.

8.- Se tiñó con Giemsa 9 minutos obteniendo un tiempo adecuado de tinción.

9.- Una vez teñidas las laminillas se evaluaron a través del microscopio óptico con el objetivo de 100x y se determinaron los siguientes parámetros :

a) Índice mitótico :

Se obtuvo al contar el número de células que se encuentran en etapa de metafase contenidas en un total de 1000 células/cultivo/concentración.

b) Cinética de proliferación celular :

Se contó el número de metafases en primera, segunda y tercera división contenidas en 100 metafases/cultivo/concentración.

El Índice de replicación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{1(\% \text{ metafases } 1a.) + 2 (\% \text{ metafases } 2a.) + 3 (\% \text{ metafases } 3a)}{100}$$

c) Cuenta de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) :

Con el objetivo de 25x se localizaron las metafases que se encontraran en segunda división, y se procedió a contar los intercambios de cromátidas hermanas con el objetivo de 100x, esto se realizó en un total de 25 metafases para cada una de las concentraciones empleadas de ambos compuestos.

10.- Los resultados obtenidos experimentales se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad InStat tm con las pruebas Análisis de varianza (ANOVA) Tukey-Kramer.

IV. RESULTADOS

En las siguientes tablas y gráficas se muestran los resultados obtenidos a través del trabajo experimental.

En la tabla 1 y gráficas 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos de la cinética de proliferación celular de nifedipino y DHP-4, mientras que en la gráfica 3 se compara la actividad del índice de replicación de los dos compuestos (nifedipino y DHP-4). En la gráficas 1 y 2 se presentan los resultados de la clasificación de primera, segunda y tercera división de nifedipino y DHP-4, como se observan en las fotografías 1,2 y 3.

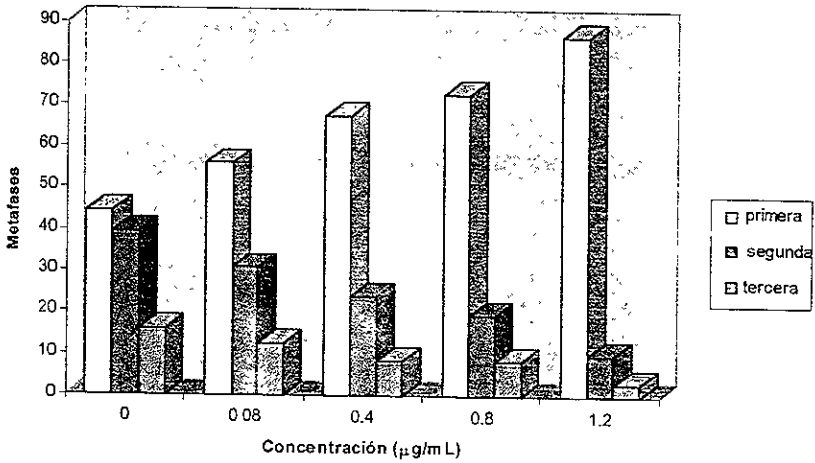
La gráfica 4 y tabla 2 muestran la actividad mitótica y la comparación de éste parámetro con nifedipino y DHP-4.

La actividad genotóxica cuantificada por medio de los intercambios de cromátidas hermanas se presentan en la gráfica 5 y la comparación de ambos compuestos 1,4-dihidropiridínicos. La tabla 3 muestra los valores de este estudio.

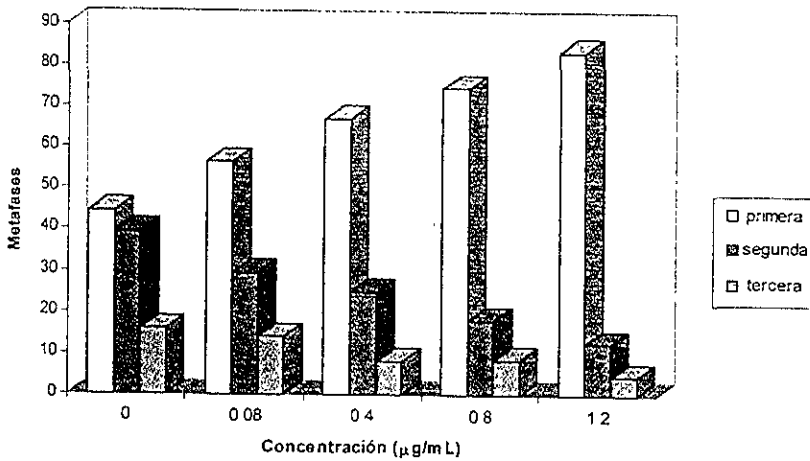
Tabla 1. Índice de replicación.

| Compuesto | Concentración (µg/mL) | M1 | M2 | M3 | Índice de replicación |
|----------------|-----------------------|------|------|------|-----------------------|
| DMSO/Etanol 3% | 0 | 44.5 | 39.5 | 16 | 1.71 |
| Nifedipino | 0.08 | 56 | 31 | 12.5 | 1.56 * |
| DHP-4 | 0.08 | 56.5 | 29.5 | 14 | 1.58 |
| Nifedipino | 0.4 | 67.5 | 24 | 8.5 | 1.41 * |
| DHP-4 | 0.4 | 67 | 25 | 8 | 1.41 * |
| Nifedipino | 0.8 | 73 | 19.5 | 7.5 | 1.34 * |
| DHP-4 | 0.8 | 74.5 | 18 | 8.5 | 1.33 * |
| Nifedipino | 1.2 | 87 | 10 | 3 | 1.16 * |
| DHP-4 | 1.2 | 83.5 | 12.5 | 4.5 | 1.21 * |

* Diferencia estadísticamente significativa. Prueba ANOVA, prueba Tukey-kramer, $\alpha = 0.05$



Gráfica 1. Cinética de proliferación celular de nifedipino.



Gráfica 2. Cinética de proliferación celular de DHP-4.

Tabla 2. Índice mitótico.

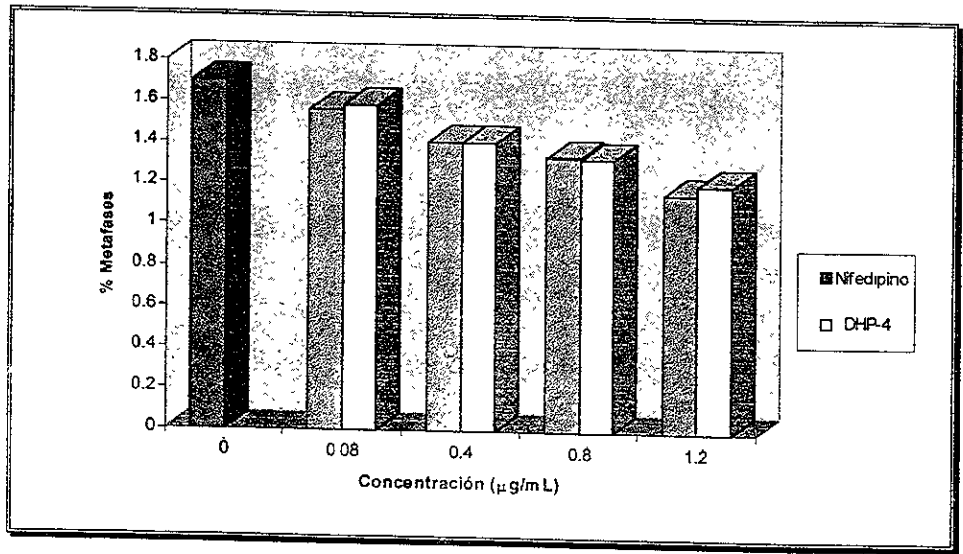
| Compuesto | Concentración (µg/mL) | Índice mitótico | ± Desviación estándar |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| DMSO/Etanol 3% | 0 | 40 | 1.4 |
| Nifedipino | 0.08 | 36.5 | 0.7 |
| DHP-4 | 0.08 | 39.5 | 0.7 |
| Nifedipino | 0.4 | 33.5 * | 0.7 |
| DHP-4 | 0.4 | 35 | 0 |
| Nifedipino | 0.8 | 29.5 * | 0.7 |
| DHP-4 | 0.8 | 31.5 * | 0.7 |
| Nifedipino | 1.2 | 25.5 * | 0.7 |
| DHP-4 | 1.2 | 27 * | 1.1 |

* Diferencia estadísticamente significativa. Prueba ANOVA, prueba Tukey-Kramer, $\alpha = 0.05$.

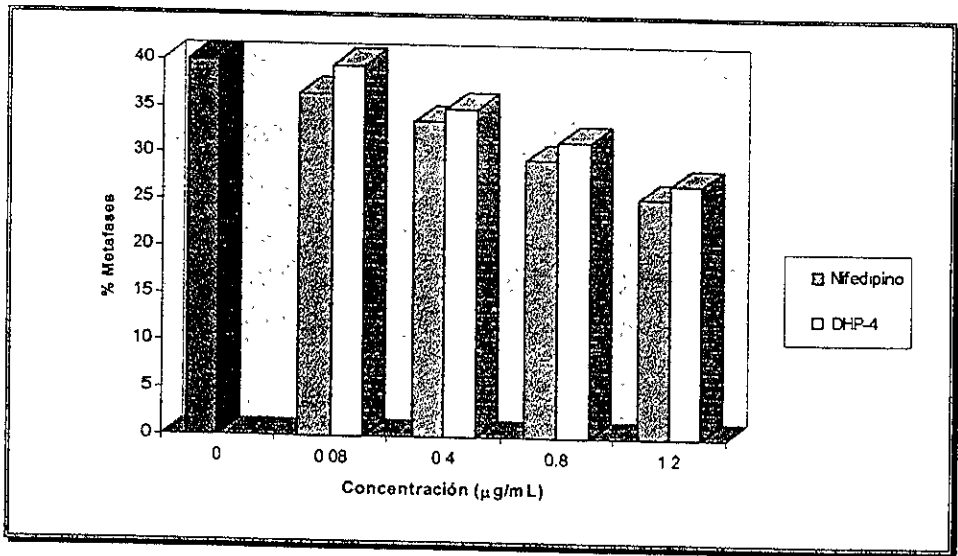
Tabla 3. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas.

| Compuesto | Concentración (µg/mL) | Frecuencia de ICH | ± Desviación estándar |
|----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| DMSO/Etanol 3% | 0 | 1.88 | 0.6 |
| Nifedipino | 0.08 | 2.28 | 0.7 |
| DHP-4 | 0.08 | 2.1 | 0.5 |
| Nifedipino | 0.4 | 3.22 * | 0.5 |
| DHP-4 | 0.4 | 3.02 * | 0.4 |
| Nifedipino | 0.8 | 3.44 * | 0.6 |
| DHP-4 | 0.8 | 3.3 * | 0.4 |
| Nifedipino | 1.2 | 4.18 * | 0.4 |
| DHP-4 | 1.2 | 3.94 * | 0.2 |

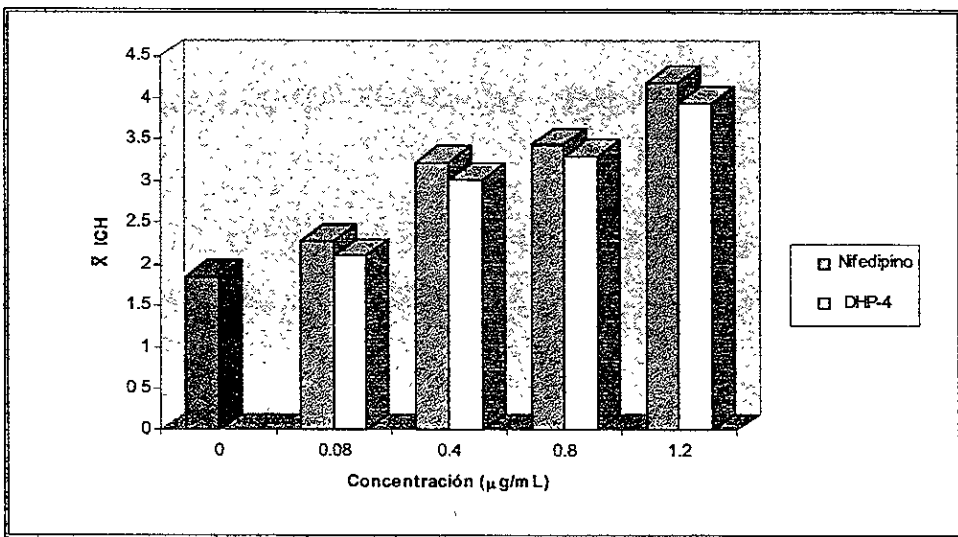
* Diferencia estadísticamente significativa Prueba ANOVA, prueba Tukey-kramer, $\alpha = 0.05$.



Gráfica 3. Comparación del índice de replicación.



Gráfica 4. Comparación del índice mitótico



Gráfica 5. Comparación de ICH producidos por nifedipino y DHP-4.

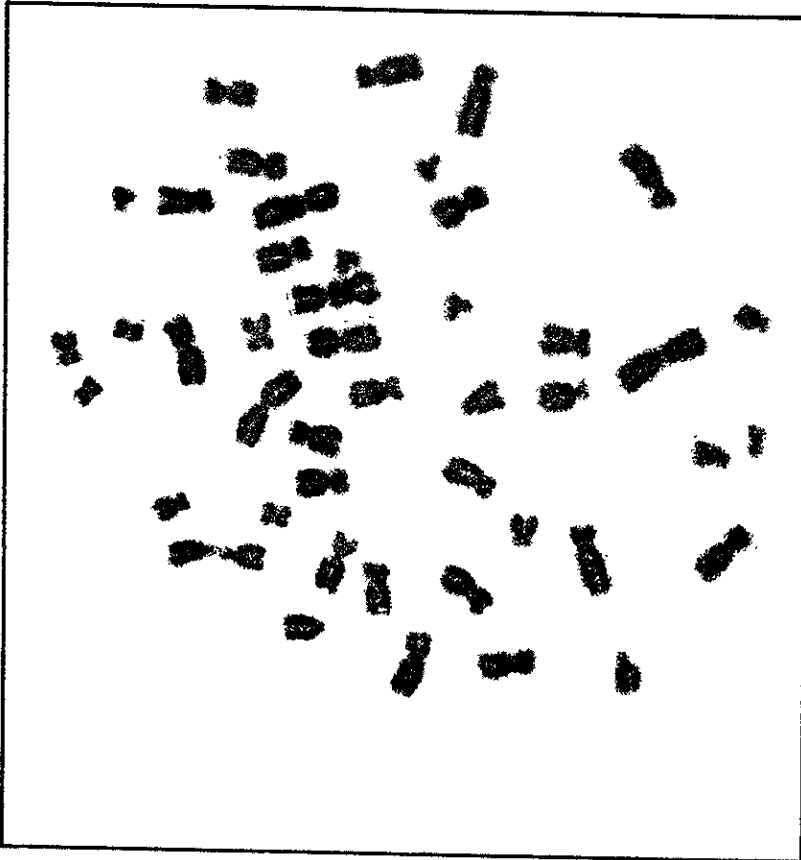


Foto No. 1. Metafase de primera división celular, en donde se observa que ambas cromátides se tiñen igual (100x).



Foto No. 2. Metafase de segunda división, donde se aprecia una cromátide clara y otra obscura. La flecha indica un ICH doble, producidos por la concentración de $1.2 \mu\text{g/mL}$ de nifedipino (100x).



Foto. No. 3. Metafase de tercera división, nótese la diferencia de tinción entre los cromosomas (100x).

V. DISCUSION

El nifedipino es el antihipertensivo que representa al grupo de los antagonistas de calcio, pero aún cuando está ampliamente extendido su uso, la disponibilidad de los estudios de genotoxicidad, especialmente el ensayo de intercambios de cromátidas hermanas no se ha realizado. Según información de los Laboratorios Bayer y Siegfried Rhein se han realizado los estudios de mutagenicidad como son: la prueba de Ames, dominantes letales y micronucleos.

El PLM 1996 indica que en estudios amplios de experimentación no se observaron efectos de mutagénesis, pero no remite a bibliografía científica, por ello, consideramos importante este trabajo, en donde estudiamos el potencial genotóxico de un derivado de esta molécula, someterla a la misma evaluación.

En la primera tabla que se presenta en resultados (tabla 1), tenemos la respuesta de proliferación de los linfocitos humanos al ser expuestos tanto a DHP-4 como a nifedipino a concentraciones que fueron semejantes a las plasmáticas y séricas máximas que se alcanzan después de 30-60 minutos de la administración oral y que corresponden a 0.065 - 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en un organismo adulto, ya que en estudios previos exponíamos a los linfocitos a concentraciones más altas y provocaban muerte celular. Se observa una tendencia a disminuir el número de células en división al ir aumentando la concentración de los antihipertensivos en el cultivo celular, donde desde la primera concentración de nifedipino resulta estadísticamente significativo, mientras que para DHP-4 esta diferencia se aprecia a partir de la segunda concentración. Este efecto de inhibición de la división celular parece ser debido a que existe una interacción con los sitios receptores específicos de las 1,4-dihidropiridinas y fitohemaglutinina, ya que Dupuis Gilles (1993), encontró que los sitios de estos compuestos son en los canales de calcio tipo L. Posteriormente Sunch (1997) demuestra que en la subunidad $\alpha 1$ de estos canales existe un sensor de voltaje denominado S4 el cual es el sitio específico de las 1,4-dihidropiridinas, y que fitohemaglutinina se une al

sitio receptor que son oligosacáridos específicos ligando proteínas que están involucradas en los procesos de activación del linfocito en este caso podrían estar localizadas sobre los canales de calcio, además de que conduce a la expresión del receptor de IL-2 en ausencia de calcio extracelular y entonces la célula prolifera de forma disminuida, ésta información esta justificada por Gelfand (1986) demostrando que los antagonistas de calcio evitan la inducción de la PHA y que en paralelo el linfocito incrementa la concentración de calcio intracelular desencadenando la expresión del receptor de IL-2 y la secreción de ésta interleucina para la proliferación celular.

La cinética de proliferación celular se vio modificada en presencia de las dihidropiridinas retardando el ciclo celular, es decir que a mayor concentración de estos compuestos existe un mayor número de metafases de primera división , y menor número de segunda división y por lo tanto pocas células llegaron a la tercera división celular. Comparando a las dihidropiridinas la DHP-4 mostró a partir de la segunda concentración diferencias estadísticamente significativas, mientras que nifedipino en la primera concentración muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al control experimental, tanto nifedipino como DHP-4 disminuyen la cinética de proliferación celular debido a estas moléculas bloquean la entrada de calcio al linfocito y la producción de IL-2 necesarios para la división celular, cuando son estimulados por fitohemaglutinina.

La frecuencia de ICH para nifedipino es de 4.18 para la concentración más alta de 1.2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la obtenida para DHP-4 para la misma concentración es de 3.94. Ambos compuestos muestran diferencias estadísticamente significativas a partir de la segunda concentración. Estos resultados indican que los compuestos dihidropiridínicos son agentes genotóxicos es decir que interaccionan con el DNA.

Se sabe que los sustituyentes en las 1,4-dihidropiridinas ejercen ciertos efectos farmacológicos como son antihipertensivo, antiarrítmico, vasodilatador analgésico y cardioprotector, pero poco se sabe como influyen en la

genotoxicidad de la molécula, por lo que este trabajo forma parte de una serie de estudios para la evaluación de estos compuestos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VII. BIBLIOGRAFIA

ALDERMAN, Michel. ; W.J. Elliott. ; S. Oparil. ; A. Wood. 1995. "Hipertensión." Atención Médica, vol. 8, No. 1, pp. 29-41.

BERRIDGE, J. Michel. 1985. "Base molecular de la comunicación intracelular." Investigación y Ciencia 111. pp. 112-122.

BERRIDGE, Michel. ; R.F. Irvine. 1989. "Inositol phosphates and cell signalling." Nature 341. pp.197-205.

BIRX, L. D. ; M. Berger. 1984. "The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents." The Journal of Immunology, 133. pp. 2904-2909.

BONDANI, Augusto. 1982. La seguridad de un nuevo medicamento : estudios toxicológicos. Centro Mexicano de Desarrollo e Investigación Farmacéutica. 53 pp.

BRAZY, P. C. ; J.F. Fitzwilliam. 1990. "Progressive renal disease : Role of race and antihypertensive medications. Kidney 37. pp. 1113-1119.

CHALLIS, R.J. ; R.A : Wilcox. 1996. "Intracellular Channels." Reception and Ion Channel Nomenclature Supplement. Trends in Pharmacological Sciences.

CONH, N.J. ; Pamley. ; W. Weart. 1997. "Uso apropiado de los antagonistas de calcio." Atención Médica. pp. 14-29.

DUPUIS, G. ; J.P. Doucet. 1981. "Separation and localization on sodium dodecyl sulfate polycrylamide gels of pig spleen lymphocyte plasma membrane proteins

- which bind ^{125}I -labelled phytohemagglutinin." Quebec, Canada. *Biochimica et Biophysica Acta* 669. pp 170-182.
- DUPUIS, G. ; F. Aoudjit. 1993. "Effects of modulators of cytosolic Ca^{2+} on phytohemagglutinin-dependent Ca^{2+} response and interleukin-2 production in Jurkat cell." Quebec, Canada. *Journal of Leukocyte Biology* 53. pp. 66-72.
- FURUICHI, T. ; S. Yoshikama. ; A. Miyamari. ; K. Wada. ; N. Maeda. ; K. Mokoshiba. 1989. "Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-Triphosphate-binding protein P_{400} ". Okizaki, Japan. *Nature* 342. pp.32-38.
- GALINDO, R. S. ; D.A. Pedraza. ; A. L. Angeles. ; R. Martinez. 1994. "Valoración del efecto hipotensor de seis nuevas dihidropiridinas en el modelo de presión arterial en rata anestesiada." *Memorias de investigación multidisciplinaria*. pp. 91-100.
- GARCIA, P. P. ; P. Flores. ; K. Pacheco. ; G. M. Velázquez. ; E. Angeles. ; M.G. Posada. ; M. Martinez. 1994. "Evaluación del efecto analgésico y antiinflamatorio de 1,4-dihidropiridinas a partir de la síntesis de hántzsch." *Memorias de investigación multidisciplinaria*. pp. 104-105.
- GELFAND, W. E. ; R. K. Cheung. 1986. "Characterization of the role for calcium onflux in mitogen induced triggering of human T cells. Identification of calcium dependent and calcium independent signals." Toronto, Canada. *Eur. Journal Immunology* 16. pp. 173-181.
- GELFAND, W. E. ; R. K. Cheung. 1988. "Uptake of extracellular Ca^{2+} and not recruitment from internal stores is essential for T lymphocyte proliferation." *Eur. Journal Immunology* 18. pp. 917-922.

GOODMAN, Alfred. ; Hardman J. G. ; Lumbird L. E. ; Molinoff P. B. ; Ruddon R.B. 1997. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México, Interamericana, vol. I. 1289-1297 pp.

HATAKEYAMA, M. ; M. Tsudo. 1992. "interleukin-2 receptor β chain gene : generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA 's." Science 257. pp. 379-382.

HERBETTE, Leo.; Preston Mason R. 1992. "Techniques for determining membrane and drug-membrane structures: A Reevaluation of the binding of lipid-soluble drugs to their receptors in heart and brain." The heart and cardiovascular system. pp. 417-433.

HOSEY, M. ; M. Lazdunski. 1988. "Calcium channels : molecular pharmacology, structure and regulation. " Nice, France. The Journal of Membrane Biology 104. pp. 81-105.

IKUSHIMA, T. 1989. "SCE Enigma : methodology, mechanism and mering of sister chromatid exchange." Annv. Rep. Res. Reactor Inst. 22. pp. 55-77.

INEGI, 1999. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Información Estadística del Sector Salud y Seguridad Social, Cuaderno No. 6.

JOINT National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure : The Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNCV). Arch Intern Med. 1993 ; 153. pp. 154-183.

KUNO, M. ; p. Gardnet. 1987. "Ion channesis activated by inositol 1,4,5-triphosphate en plasma membrane of human T lymphocytes." Nature 26. pp. 301-304.

LATT, A. S. ; R. R. Screck. ; K. S. Loveday. ; C. F. Shuler. 1979. "In vitro and in vivo analysis of sister chomatid exchange." Massachusets, U.S.A. Pharmacological Reviews 30. pp. 501-535.

MANCIA, G. 1995. "Variabilidad de la presión arterial y tratamiento antihipertensivo : valor pronóstico para la prevención de las complicaciones cardiovasculares tardías." Memorias del Simposio de Cardiología. XV Congreso Interamericano, Santiago de Chile. pp. 9-11.

MEREDITH, A. P. 1995. "Relación trough to peak y control de 24 horas de la presión arterial ." Memorias del Simposio de Cardiología. XV Congreso Interamericano, Santiago de Chile. pp. 4-6.

MORALES Rámirez Pedro.1988. "El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas." Ciencia y desarrollo . 81. pp. 65-72.

MURPHY, J. B. ; C. A. Rogers. ; R. K. Sunahara. ; S. Lemaire. ; B. S. Tuana. 1989. "Identification, characterization, and photoafinity labeling of the dihidropiridine receptor associated with the L type calcium channel from bovine adrenal medulla." Ontario, Canada. Molecular Pharmacology 37. pp. 173-181.

NEATON J. D. ; Grimm R.H. ; Prineas R. J. 1993. Treatment of Mild Hypertension Study : Final resultas. JAMA 230. pp. 713-124.

PAQUTTE, L. 1992. Fundamentos de química heterocíclica. Limusa. México.

- PLM, 1996. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 42 ed. 2024 pp.
- SALAMANCA GOMEZ, Fabio. 1990. Citogenética humana. México. Editorial Médica panamericana. 400 pp.
- SALDAÑA JESUS. La hipertensión. Ed. Diana México. 1a. ed. 256 pp.
- SALVA Miquel, J. 1987. "Posibilidades farmacológicas de los antagonistas del calcio." Tratado de Medicina Práctica MEDICINE. pp. 402-408.
- SASAKI, M. 1982. "Role of chromosomal mutation in the development of cancer." Cytogenetics Cell Genetic 33. pp. 160-168.
- SCHMIDT, R.F.;Thews G. 1993. Fisiología humana, Ed. Interamericana, 24a. ed. pp. 906.
- SCHWARTZ J. C. 1995. "Protección cardiovascular y renal." Memorias del Simposio de Cardiología. XV Congreso Interamericano, Santiago de Chile. pp. 14-17.
- SMITH, L. ; S. Thier. 1993. Fisiopatología principios biológicos de la enfermedad. Médica Panamericana. pp. 1340.
- S.P. Alexander.; J.A. Peter. 1997. "Channels Ca²⁺." Receptor Ion Channel Nomenclature Supplement, Trends in Pharmacological Sciences. pp. 78-79.

SNUTCH, P.T; M.M. Gilbert. 1997. "Molecular structure of Ca²⁺ channels." Receptor and ion channel nomenclature supplement. Trends in Pharmacological Sciences.

SOBELS, F.H. 1987. "In vitro testing as a step in the evaluation of in vivo genotoxicity." Mutation Research 189. pp. 7-10.

VERMA S. Ram.; A. Babu. 1995 . Human Chromosomes Principles and Techniques. McGraw-Hill. 419 pp.