



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL A LOS
EFECTOS GENOTÓXICOS DE LAS
ANFETAMINAS Y SU POSIBLE RELACIÓN
CON LOS POLIMORFISMOS DE CYP2D6

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

ELIAS MIRANDA GONZÁLEZ

Tutor: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET



MÉXICO, D. F.

MAYO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet a quien admiro y respeto no sólo por ser una excelente profesional, sino por brindarme su amistad incondicional, apoyo y consejo constante.

A los integrantes de mi comité tutorial Dr. Jorge Vázquez Ramos y al Dr. Marco Antonio Cerbón por su apoyo y seguimiento a mi formación profesional.

A los integrantes del comité tutorial ampliado quienes con sus comentarios y asesoría contribuyeron a mejorar el presente trabajo

Agradezco la asesoría técnica de Monserrat Sordo Cedeño quien me apoyo y oriento en la parte técnica de este proyecto doctoral.

Agradezco a Leticia García quien me apoyo y oriento en todos los aspectos administrativos durante el desarrollo del doctorado.

Agradezco a mis amigos y compañeros del:

- Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM.
- Laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación y Medicina Preventiva de la secretaria de Comunicaciones y Transportes.

El proyecto fue apoyado CONACYT, PAPIIT y PAEP-UNAM.

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

DEDICATORIA

Escribo estas líneas como un acto de reflexión de lo que significa esta fase de mi vida, incontables ocasiones soñé con el momento de escribir la parte final de la tesis doctoral, y lo consideraba la parte culminante del proyecto; la soñada cima de la montaña. Sin embargo el estar en este punto me permite ver de manera clara lo siguiente:

Lo que realmente valió la pena fue el camino para llegar a la cima de la montaña, durante el viaje tuve que enfrentarme con múltiples obstáculos y en muchos de ellos fui ayudado por amigos y maestros que fungieron como verdaderos ángeles; cuyo consejo y apoyo colocaron cada cosa en su lugar y me ayudaron a conseguir mucho más de lo que mi capacidad podía permitirme. Además de alegrar y hacer inolvidables múltiples momentos.

Por lo que dedico esta tesis a todos aquellos amigos, familiares y que decir de mis seres amados que me han acompañado durante este trayecto de manera incondicional.

En la antigüedad se sabía que un buen guerrero no olvidaba la gratitud y tenía siempre presente a sus amigos, porque la sangre de ellos se había mezclado con la suya en el campo de batalla, dejando huellas indelebles en su corazón y memoria.

He decidido a diferencia de mis tesis de licenciatura y maestría no escribir nombres porque sería lamentable que por razones de espacio o premura para entregar esta tesis omita a alguno de todos los que me acompañaron en este proyecto de mi vida.

INDICE

	PAG.
1. RESUMEN.....	4
1.1 ABSTRACT.....	6
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
3.1. EL CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO.....	8
3.1.1 Consumo en México.....	9
3.1.1.1 Consumo en el Transporte Federal.....	10
3.2 ANFETAMINAS.....	11
3.2.1 Farmacocinética de las anfetaminas.....	12
3.2.2 Efectos tóxicos del consumo.....	14
3.2.3 Interferentes de anfetaminas.....	15
3.3. TOXICOLOGÍA.....	16
3.4. TOXICOLOGÍA GENETICA.....	17
3.5. GENOTOXICIDAD.....	19
3.5.1. Alteraciones del ADN que implican efectos genotóxicos.....	19
3.5.1.1. Tipos de mutaciones en la molécula de ADN.....	21
3.5.1.2. Origen de las mutaciones espontáneas.....	22
3.5.1.3. Lesiones debidas a la acción de agentes físicos y químicos.....	23
3.5.2. Ensayos empleados para evaluar Citotoxicidad, Genotoxicidad y daño al ADN.....	25
3.5.2.1 Ensayo FDA/BrEt empleado para evaluar la citotoxicidad.....	25
3.5.2.2. Ensayo de micronúcleos.....	25
3.5.2.3. Ensayo cometa o técnica de electroforesis unicelular.....	26
3.6 TOXICOGENOMICA.....	28
3.7. CITOCROMO P450.....	29
3.7.1. CYP2D6.....	30
3.7.1.1. VARIETADES ALELICAS.....	32
3.7.1.2. VARIABILIDAD POBLACIONAL.....	33
3.7.1.3. IMPORTANCIA CLÍNICA.....	34
3.8. EL CICLO CELULAR.....	36
3.8.1. La proliferación celular.....	37
3.8.2. El control del ciclo.....	37
3.9. APOPTOSIS.....	39
3.9.1. Relación de la apoptosis con el ciclo celular.....	42
3.9.2. Control de la apoptosis.....	43

4. HIPÓTESIS.....	48
5. OBJETIVOS.....	48
6. METODOLOGÍA.....	50
6.1. FASE I.....	50
6.1.1. Detección de anfetaminas en orina de individuos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	50
6.1.1.1 Población de estudio y obtención de muestras.....	50
6.1.1.2 Proceso de extracción y derivación de las anfetaminas.....	50
6.1.1.3 Condiciones del cromatógrafo de gases masas (CG/EM).....	51
6.2. FASE II.....	51
6.2.1. Muestras, extracción y cultivo de linfocitos.....	51
6.2.2. Evaluación de la citotoxicidad de anfetaminas.....	52
6.2.3. Evaluación de la citostaticidad y genotoxicidad de las anfetaminas.....	52
6.2.4. Ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales (SCGE).....	53
6.2.5. Determinación del genotipo de CYP2D6 de los individuos evaluados.....	53
6.2.5.1. Amplificación del gen CYP2D6.....	54
6.2.5.2. PCR anidado.....	54
6.2.5.3. Variedades alélicas CYP2D6*2, *34 y *9 mediante un fragmento de 386 pb.....	55
6.2.5.4. Variedades alélicas CYP2D6*2, *4, *10 mediante un fragmento de 881 pb.....	55
6.2.5.5. Variedades alélicas CYP2D6*4, *10 mediante un fragmento de 433 pb.....	55
6.2.5.6. Variedades alélicas CYP2D6*4, *6 mediante un fragmento de 353 pb.....	56
6.2.5.7. Variedades alélicas CYP2D6*3 mediante un fragmento de 201 pb...	56
6.2.5.8. Detección de la delección del gen CYP2D6 (CYP2D6*5).....	56
6.2.6 Detección de apoptosis por anexina.....	57
7. RESULTADOS.....	59
7.1. FASE I.....	59
7.1.1. Obtención del fenotipo determinando la relación metabólica mediante la detección de anfetaminas en orina de individuos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).....	59
7.2. FASE II.....	61
7.2.1. Efecto sobre la viabilidad celular (citotoxicidad).....	61
7.2.2. Efecto sobre la proliferación celular (citostaticidad).....	63
7.2.3. Evaluación de genotoxicidad mediante micronúcleos.....	63
7.2.4. Evaluación de genotoxicidad mediante micronúcleos aumentando la n=7...	65
7.2.5. Buscando explicaciones a la variabilidad individual.....	67
7.2.5.1. Evaluación de la capacidad del linfocito para metabolizar	

anfetaminas.....	67
7.2.5.2. Detección de la expresión del transcrito del gen CYP2D6.....	69
7.2.6. Relación genotipo CYP2D6 versus genotoxicidad.....	71
7.2.7. Correlación del % recuperado de amfetamina en sobrenadante y su relación con los genotipos detectados.....	73
7.2.8. Elucidando el posible mecanismo de acción.....	74
7.2.8.1. Evaluación de rompimientos de ADN mediante técnica cometa.....	74
7.2.8.2. Evaluación de apoptosis.....	76
7.2.8.3. Evaluación del efecto del pretratamiento con un antioxidante.....	76
8. DISCUSIÓN.....	78
9. CONCLUSIÓN.....	84
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. RESUMEN

Las anfetaminas son aminas simpaticomiméticas que incluyen un número de agentes terapéuticos y drogas ilícitas. En México son ampliamente consumidas por operadores del transporte público federal, por jóvenes que las adquieren en centros nocturnos, así como por individuos que las emplean para la reducción de peso.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el fenotipo en consumidores de anfetaminas y el potencial genotóxico de estas drogas. El estudio consistió de dos fases:

1. El análisis del fenotipo metabólico en individuos consumidores de anfetaminas.
2. La evaluación in vitro de la genotoxicidad de la anfetamina y la metanfetamina.

En la primera fase dado que las implicaciones éticas y legales dificultan la investigación del metabolismo de las anfetaminas en humanos sanos, el estudio se realizó en las muestras obtenidas de conductores detectados en los programas realizados por la Secretaria de Comunicaciones y Transportes. En 1000 muestras de orina obtenidas en carreteras federales, 109 individuos fueron identificados como consumidores de anfetaminas; la anfetamina fue la principal droga de consumo. El fenotipo de los 109 individuos se obtuvo mediante la determinación de la Relación Metabólica (RM), que permitió con base a la cantidad del metabolito y en la clasificación para otros substratos del citocromo que metaboliza a las anfetaminas (CYP2D6), identificar que existían 3 fenotipos: metabolizadores rápidos (MR), metabolizadores intermedios (MI) y metabolizadores lentos (ML).

En la segunda fase se llevo a cabo un estudio en cultivos de linfocitos tratados con anfetamina y metanfetamina in vitro, para evaluar sus efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos. Los resultados muestran que concentraciones de ambas anfetaminas, que se pueden encontrar en la sangre de los consumidores, son citotóxicas y citostáticas. Sin embargo, solo en algunos individuos se observó un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos, prueba asociada a genotoxicidad.

Buscando una explicación a las diferencias individuales observadas, se corroboró la capacidad del linfocito de metabolizar a las anfetaminas, detectando la expresión de la enzima CYP2D6, así como del metabolito 4-hidroxilado. Así también, por ser el CYP2D6 altamente polimorfo, se evaluaron las principales variantes alélicas en las muestras estudiadas. Lo anterior permitió relacionar la frecuencia de micronúcleos con el genotipo de CYP2D6, encontrándose que los individuos con la variedad alelica *2 presentaban una mayor genotoxicidad. Experimentos

adicionales con muestras de estos individuos utilizando la técnica cometa, mostraron rompimientos de ADN de una sola cadena y mediante la determinación de anexinas se confirmó la inducción de apoptosis, que pudo ser revertida por la adición de dimetiltiourea que es un inhibidor de radicales libres.

Los resultados obtenidos tienen implicaciones relevantes para los usuarios de anfetaminas puesto que los ML pueden presentar mayor riesgo de sobredosis y por consecuencia mayores efectos farmacológicos y toxicológicos. Las consecuencias que estas diferencias puedan tener en la conducción de automóviles y la frecuencia y severidad en los accidentes requieren ser estudiadas.

Nuestros datos indican que existen diferencias individuales en la genotoxicidad producida por las anfetaminas, producto de diferencias en su metabolismo, lo que pudiera tener consecuencias biológicas de importancia, como la susceptibilidad a desarrollar enfermedades como cáncer o enfermedad de Parkinson.

1.1. ASTRACT

Amphetamines are a class of sympathomimetic amines that include a number of therapeutic agents and illicit drugs. In Mexico they are widely used by truck drivers, youngsters attending nightclubs and people undergoing weight loss regimens. The aim of the present study was to determine the phenotype of amphetamine consumers and the genotoxic potential of these drugs. The study was carried out in two phases:

1.- The first one was to determine the metabolic ratio (MR) in 109 urine specimens from federal highway drivers who were amphetamine positive in random mandatory roadside drug tests. The statistical analysis of the MR showed the presence of three different phenotypes, which according to the established groups for CYP2D6 and the amount of the drug metabolized correspond to extensive metabolizers (EM), intermediate metabolizers (IM) and poor metabolizers (PM).

2.- The second phase was to examine the genotoxic effects of amphetamine and methamphetamine *in vitro*. Amphetamine effects were evaluated in human peripheral blood lymphocytes (HPBL). The cytokinesis blocked Micronuclei (MN) Assay was used for genotoxicity determination. Individual differences in the amount of MN induced by both amphetamines were observed. Given that CYP2D6 enzyme is involved in the oxidative metabolism of amphetamines, the expression of CYP2D6 was evaluated. Data showed that lymphocytes are able to express a functional CYP2D6, suggesting that amphetamines are metabolized by CYP2D6 in HPBL. Since CYP2D6 is a highly polymorphic gene, nine different polymorphisms were evaluated; The highest induction of MN was found in individuals having the allele 2. Our findings suggest that the interindividual variation in the genotoxicity induced by amphetamines could be related to individual differences in metabolism.

To understand the mechanism of amphetamines genotoxicity, additional experiments were carried out. Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) or "Comet Assay" showed the induction of single DNA breakage, while annexin determination confirmed the induction of apoptosis. Addition of dimethylthiourea attenuated apoptosis induction, implicating a role for free radicals in the observed effects.

The biological consequences of the individual differences in amphetamine metabolism, such as the development of cancer or Parkinsons, the risk of addiction or even impaired driving, need to be further studied.

2. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Las anfetaminas son drogas de amplio consumo en nuestro país, tres grupos han mostrado un mayor consumo de estas sustancias: Los operadores del transporte público federal específicamente del sector carretero, en lo cuales la anfetamina es la droga de mayor consumo constituyendo uno de los factores causales de accidentes. El segundo sector de la población que ha presentado un aumento en su consumo es el de los jóvenes, quienes las pueden adquirir como drogas de “club” principalmente en lugares de esparcimiento (centros nocturnos). El tercer grupo lo constituyen individuos que las emplean para disminución y control de peso, sin embargo en algunos casos ellos desconocen que las están consumiendo.

La mayoría de los estudios acerca de los efectos del consumo de anfetaminas se refieren a los problemas de adicción y efectos sobre sistema nervioso central. Los estudios en otros sistemas son escasos. Reportes aislados realizados en modelos de roedores y en linfocitos in vitro sugieren que las anfetaminas pueden producir alteración del ciclo celular y daño al material genético. En modelos animales se ha mostrado que el citocromo P450 2D6 (CYP2D6) esta involucrado en la 4-hidroxiación de la anfetamina y que la hidroxilación del anillo aromático o sus sustituyentes son la principal vía metabólica. Se ha reportado la existencia de polimorfismos en el citocromo CYP2D6 y que varios de ellos son capaces de alterar la función enzimática de este citocromo. Adicionalmente se han descrito diferencias en la distribución de los polimorfismos en diferentes razas. Por lo anterior si el CYP2D6 participa en el metabolismo de las anfetaminas, la presencia de polimorfismos tiene implicaciones importantes no sólo en el metabolismo de las mismas, sino en el papel del mismo en los efectos tóxicos y posiblemente en los factores de adicción. Resulta interesante estudiar la influencia de estos polimorfismos en el metabolismo de las anfetaminas y en sus posibles efectos.

El presente proyecto tuvo 2 fases: En la primera se evaluó la relación metabólica de la anfetamina y su metabolito hidroxilado en orina para determinar el fenotipo de CYP2D6 en individuos consumidores de anfetaminas. En la segunda se determinaron in vitro los efectos citotóxicos y genotóxicos de la anfetamina y la metanfetamina, así como la relación de los efectos observados con los polimorfismos de CYP2D6.

3. INTRODUCCIÓN

3.1.- El consumo de Drogas de Abuso

El consumo de drogas es un problema de gran importancia y representa una amenaza para la salud y el bienestar de los seres humanos. El uso indebido de drogas sobrepasa los límites convencionales de la salud humana y tiene además nefastas consecuencias sociales, pues no solo trae aparejado el deterioro personal, familiar y de comunidades completas, sino que se halla relacionado con problemas de seguridad ciudadana, violencia familiar, abuso de menores, abandono de la escuela, disminución de competitividad, pérdida de horas de trabajo, inseguridad vial, accidentes laborales etc. Todo lo mencionado además representa una gran carga económica para el individuo y la sociedad.

En términos farmacológicos y médicos la palabra droga es cualquier sustancia química capaz de modificar el funcionamiento de un ser vivo. Este concepto se refiere a que la modificación puede ser perjudicial o beneficiosa para el ser vivo, y que depende del tiempo de administración y de la dosis. Paracelso, padre de la farmacología, en 1500 dijo que todas las sustancias son venenos. La diferencia entre un veneno y un medicamento es la dosis.

Popularmente, el término droga suele utilizarse preferentemente para referirse a las de uso ilegal, para las de uso médico es más común el término fármaco, medicamento, o, más concretamente, droga terapéutica. El abuso de drogas ilícitas, se puede definir como el uso de un producto químico para conseguir un efecto farmacológico deseado en una forma impropia, estableciendo a su vez un patrón patológico de uso, deterioro de la actividad social o laboral. El uso compulsivo de estas drogas de abuso produce dependencia psicológica (satisfacción y deseo vehemente de consumirlas), dependencia fisiológica y tolerancia (necesidad de aumentar la dosis para obtener los efectos deseados). La intoxicación por drogas, bien de una forma aguda o crónica, produce problemas físicos y psíquicos que pueden conducir a la muerte o bien a secuelas permanentes (médico-sociales, laborales, etc).

Una definición práctica es la siguiente; "Drogas son todas aquellas sustancias que producen dependencia y que se emplean voluntariamente para provocarse determinadas sensaciones o estados psíquicos no justificados terapéuticamente."

Existe evidencia de que antes de que se establecieran las primeras civilizaciones, el hombre ya conocía los efectos de ciertas plantas como la adormidera del opio. En todas las civilizaciones, desde la asiría hasta la actual del siglo XXI, el ser humano ha consumido todo tipo de drogas por distintos motivos, tales como: religiosos, rituales, medicinales, hábito o costumbre, distracción o hedonismo. En la cultura occidental la droga es considerada un tema tabú y a inicios del siglo XX, se dictaron las primeras leyes contra el uso de drogas (Davenport 2001). Un ejemplo de prohibición fue la conocida ley seca, mediante la cual se prohibió el alcohol en los Estados Unidos. La prohibición fracasó estrepitosamente y fue el origen de que ciertos grupos que comenzaron traficando con alcohol, al ser éste legalizado, iniciarán con el tráfico de drogas que seguían prohibidas.

Las drogas más utilizadas en los países occidentales son:

Cocaína

Marihuana (canabinoides)

Hachís

MDMA o éxtasis

Anfetaminas (anfetamina y metanfetamina)

Opiáceos (Heroína, Morfina, etc.)

Inhalantes

LSD (ácido lisérgico)

Peyote (mescalina)

Hongos psilocibes, también conocidos como alucinógenos o mágicos

Benzodiacepinas

Barbitúricos

Fenciclidina

3.1.1 Consumo en México

En nuestro país se han publicado múltiples encuestas sobre el consumo de drogas, la última que se publicó fue en el año 2002 (Encuesta Nacional de Adicciones). En esta encuesta se evaluó el consumo de 10 tipos de sustancias con efectos psicotrópicos como son la marihuana, inhalables, alucinógenos, cocaína, derivados de la hoja de coca, heroína; estimulantes tipo anfetamínico y drogas con utilidad médica usadas sin prescripción médica como son opiáceos, tranquilizantes, sedantes y estimulantes.

La droga de mayor consumo en México, sin considerar al tabaco o al alcohol, es la marihuana, 2.4 millones de personas la han probado alguna vez en una proporción de 7.7 hombres por cada mujer. Poco más de 2 millones viven en población urbana y el resto en la población rural. Cuando únicamente se considera a los hombres urbanos la proporción de uso aumenta a 7.58%, y en el grupo entre 18 y 34 años que es el más expuesto, la proporción aumenta a 10.01%. La cocaína ocupa el segundo lugar en las preferencias de la población, el 1.44% de la población urbana la ha usado y por cada 4 hombres que la consumen hay una mujer. De la población total, el 1.23% del uso se da en forma de polvo, 0.04% en forma de pasta y 0.10% en forma de crack. La mayor proporción de usuarios tienen entre 18 y 34 años. Después de la marihuana y la cocaína, siguen en orden de preferencia, los inhalables y los estimulantes de tipo anfetamínico y en último lugar la heroína y los alucinógenos. Sin embargo, en el grupo de 12 a 17 años, el índice de consumo de inhalables es ligeramente superior al de cocaína.

3.1.1.1. Consumo en el Transporte Federal de México

En ambientes laborales los patrones de consumo pueden variar de una forma característica y dependiente del tipo de trabajo. Lo anterior se ejemplifica con un reporte publicado en el 2001 (www.conadic.gob.mx) y que evalúa el patrón de consumo en diferentes modos de transporte a nivel Federal (Tabla A).

TABLA A

TIPO DE CONDUCTOR	MUESTRAS ANALIZADAS	MUESTRAS POSITIVAS	%	PORCENTAJE POR TIPO DE DROGA		
				CANNABIS	COCAÍNA	ANFETAMINAS
Carretero	48,050	2,808	5.8	16.0	25.3	58.7
Marítimo	967	51	5.3	54.9	23.5	21.6
Ferroviano	2,424	31	1.3	29.0	67.7	3.2
Aéreo civil	3,583	13	0.4	38.5	38.5	23.1
Total	55,024	2,903	5.3	16.9	25.8	57.3

Como se observa en la tabla A, el consumo de anfetaminas constituye un problema al ser la principal droga de consumo en operadores del transporte público federal, específicamente en el sector carretero.

3.2 ANFETAMINAS

Las anfetaminas pertenecen a un grupo muy amplio de derivados químicos (aminas simpaticomiméticas) con actividad sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), ocasionan en quienes las consumen reducción del apetito, hiperactividad y sensación general de bienestar, sin embargo, por presentar una elevada actividad a nivel del SNC tienen un alto riesgo de producir dependencia y adicción (Cox et al, 1983).

En la actualidad el término anfetaminas incluye compuestos relacionados estructuralmente como son la anfetamina, metanfetamina, hidroxianfetamina e hidroximetanfetamina. La anfetamina fue sintetizada en 1887, sin embargo, muchos años después se descubrió la principal actividad farmacológica de esta molécula. Fue en 1920 cuando investigando un sustituto de la efedrina se descubrió que las anfetaminas presentaban propiedades estimulantes del SNC, así como utilidad clínica en la narcolepsia y en el síndrome hiperactivo en niños. En 1932 la anfetamina fue comercializada como descongestionante nasal y como estimulante respiratorio (bencedrina inhalada), para 1937 se registraron nuevos compuestos de anfetaminas como fármacos broncodilatadores, anoréxicos y antidepresivos. Durante la segunda guerra mundial, los alemanes y sus aliados usaban las anfetaminas en sus batallas para combatir la fatiga y mantener en estado de alerta en sus tropas. En Japón se dispuso de un gran suministro de anfetaminas para los jóvenes en el periodo de la posguerra, lo que originó abuso epidémico que se frenó o disminuyó con castigos crueles. Paralelamente a la amplia difusión de su empleo terapéutico, se hicieron evidentes los efectos indeseables de estas sustancias y su alto potencial de abuso (Katzung 1996). Como resultado de esto la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América) en 1959 en un intento de frenar su alto consumo, prohibió la comercialización de varios derivados de anfetaminas. En México la Encuesta Nacional de Adicciones del 2002 (ENA 2002) muestra al consumo de anfetaminas en el cuarto lugar de las drogas de mayor consumo en nuestro país, siendo los jóvenes de 18 - 20 años los de la más alta incidencia.

Estructura Química. Las anfetaminas son bases débiles cuyos pKas oscilan alrededor 9.7 a 9.9, son producidas por medio de síntesis química en la industria farmacéutica o en laboratorios clandestinos. Las anfetaminas son derivados de la feniletilamina (*figura A1*), que es la estructura base de todas las aminas simpaticomiméticas y las sustancias naturales adrenérgicas como la epinefrina (adrenalina) y la norepinefrina (noradrenalina). Estructuralmente, la diferencia química entre la anfetamina (*figura A2*) y la metanfetamina (*figura A3*), radica en la sustitución de un hidrógeno en el grupo amino por un metilo para el caso de la metanfetamina, hecho que le

significa aumentar sus propiedades lipofílicas y su actividad farmacológica (Cox et al, 1983). A su vez estereoquímicamente la anfetamina y la metanfetamina presentan un centro óptico asimétrico, dando lugar a la forma racémica (dl), la dextro (d), o la levo (l) respectivamente. En las preparaciones comunes se encuentran en forma racémica.

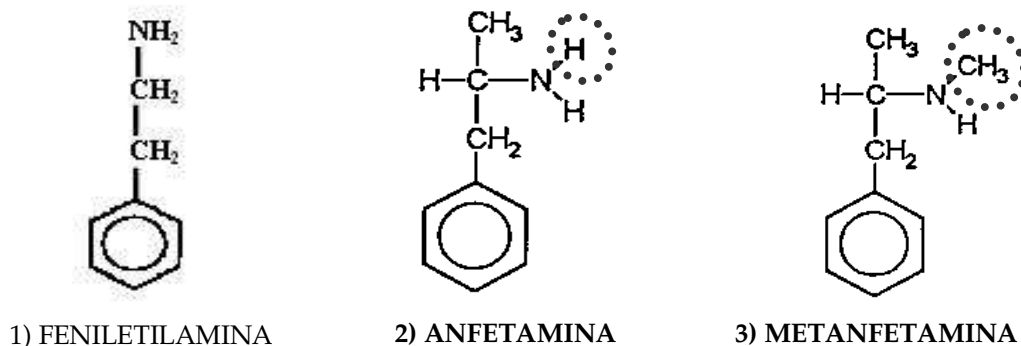


Figura A.- Estructura química de la feniletilamina, anfetamina y metanfetamina.

Propiedades Físicas. La anfetamina preparada legalmente es un polvo cristalino, de poco olor, sabor amargo o acre, soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol. Mientras que la anfetamina producida ilegalmente tiene un olor fuerte resultado de una depuración incompleta de reactivos y/o solventes usados en su fabricación.

La metanfetamina legal es un polvo cristalino, de poco olor, áspero, fácilmente soluble en agua y alcohol. Mientras que la preparación ilegal incluye: polvo fino, áspero, cristales y trozos de color blanco-amarillento de material suelto, en cápsulas y tabletas de varios tamaños y colores.

De manera general, las anfetaminas preparadas en su forma ilegal pueden llegar a contener hasta un 60 % de esta droga y otras cantidades de cocaína, atropina, mezcalina y una gran variedad de adulterantes como granos de almidón, fécula de maíz, lactosa, maltosa, silicato de magnesio, quinina y material fibroso (Cox et al, 1983).

3.2.1. FARMACOCINETICA DE LAS ANFETAMINAS

Las anfetaminas pueden consumirse por vía oral, intravenosa y por inhalación al fumarse o aspirarse por la nariz.

Absorción. Las anfetaminas se absorben rápidamente desde el tracto intestinal, el máximo nivel plasmático se obtiene en las dos primeras horas y su completa absorción requiere de 4 a 6 h.

Distribución. Las anfetaminas se distribuyen en todos los tejidos, teniendo su más alta concentración en pulmón, hígado, cerebro, bazo y riñón. La concentración en sangre tras la administración de dosis terapéuticas es baja a causa de la débil unión con las proteínas plasmáticas (16 %) y su elevado volumen de distribución (3.2 - 5.6 L/Kg) permitiéndoles llegar con relativa facilidad hasta el tejido nervioso (*Barceloux, 1988*). Está demostrado que la anfetamina también puede encontrarse en la leche humana a concentraciones 7 veces más altas que en el plasma materno; también se ha reportado la presencia de trazas de anfetamina en la orina de un neonato amamantado por la madre narcoléptica, tratada con anfetaminas (*Steiner et. al., 1984*)

Metabolismo. Las anfetaminas son metabolizadas por la fracción microsomal del citocromo CYP2D6 del hígado; estudios realizados en ratas y en ratones confirmaron que las anfetaminas son metabolizadas por el CYP2D6 (*Law et al. 2000, Kreth et al. 2000, Lin et al 1997*). Adicionalmente las evaluaciones realizadas en sistemas *in vitro* con microsomas hepáticos o levaduras transgénicas señalan al mismo citócnomo (*Wu et al. 1997*). Se ha encontrado que las anfetaminas también se metabolizan en cerebro, intestino y pulmón, donde sufren procesos de desaminación oxidativa en presencia de NADPH, Mg⁺⁺ y de oxígeno molecular, para formar fenil-acetona, ácido benzoico y ácido hipúrico. Además, por hidroxilación aromática se obtienen 4-hidroxinoanfetaminas y 4-hidroxi-norepinefrina, en un porcentaje de alrededor del 10 % de la dosis. La metanfetamina es N-desmetilada a anfetamina y formaldehído y se p-hidroxila por la enzima hidroxilasa aromática. Las anfetaminas se metabolizan en el hígado, mediante seis procesos químicos diferentes: hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, desaminación oxidativa, N-oxidación y conjugación del nitrógeno (*Cody. 1992*)

Eliminación. Alrededor del 30 % de la dosis administrada de anfetaminas, se excreta sin modificar en la orina; sin embargo, este dato es influenciado por el pH de la orina, ya que en una orina alcalina las anfetaminas se presentan en forma no ionizada y se reabsorben en gran cantidad por los túbulos renales; mientras que en una orina ácida sucede lo contrario y la excreción tiene lugar de manera más rápida (*Becket et. al., 1965, Davis et. al., 1971*).

Efecto farmacológico. La acción farmacológica más importante de la anfetamina y la metanfetamina, es su poder estimulante sobre el Sistema Nervioso Central, ya que aumenta la liberación de neurotransmisores a nivel de la sinapsis nerviosa, en particular de epinefrina, de norepinefrina y de dopamina, produciendo un aumento de la frecuencia cardíaca, de la presión

sistólica y diastólica, una mejoría en el estado de ánimo, resistencia a la fatiga física y mental, e incremento en la autoestima. Algunas de las manifestaciones psicóticas más frecuentes después de la toma de dosis elevadas de anfetaminas, están probablemente ligadas a la liberación de 5-hidroxitriptamina de las neuronas triptaminérgicas.

Síndromes clínicos generales. En países donde está permitido su uso los individuos toman oralmente de 5 a 20 mg de anfetaminas, para aliviar la fatiga, levantar el ánimo, inducir furor, bajar de peso y prolongar el insomnio. Entre los grupos de mayor consumo se encuentran los jóvenes quienes las consumen en centros nocturnos (antros) para estar eufóricos, reducir la fatiga y bailar toda la noche, también se ha descrito que los estudiantes las consumen durante la preparación de sus exámenes y para mejorar su rendimiento intelectual, lo mismo que militares y atletas para tener un alto rendimiento y algunos profesionistas y trabajadores sujetos a labores repetitivas o extenuantes, ejemplo de ellos, son los conductores de trenes y camiones (*ENA 2002, www.conadict.gob.mx*). Sin embargo, estos efectos aparentemente beneficios de las anfetaminas se pierden con el empleo repetido y en vez de ello, surge depresión, agitación y pánico (*www.nida.gov*). Además, estas drogas pueden inducir al usuario un alto gasto de energía, resultando en una fatiga excesiva y la subsecuente reducción del desempeño físico.

Derivado de que el rendimiento físico e intelectual mejora, es fácil comprender el deseo de mantener estos efectos, aparentemente beneficios, con consumo repetido que lleva pronto a un estado de dependencia psíquica y también física. Este efecto auto-reforzante está también ligado al fenómeno "rebound" que se manifiesta con depresión y astenia al suspender la acción de la droga. En individuos con tolerancia, el uso habitual de grandes dosis puede dar como resultado una psicosis tóxica caracterizada por paranoia, alucinaciones y comportamiento violento, presentando un estado de inquietud, ansiedad e irritabilidad (*Cox et al, 1983*).

3.2.2. EFECTOS TÓXICOS DEL CONSUMO

La mayoría de los estudios acerca de los efectos del consumo de anfetaminas se refieren a los problemas de adicción y efectos sobre sistema nervioso central. Los estudios en otros sistemas son escasos (Li et. al., 1998). En ratas tratadas con una planta que contiene derivados de anfetamina se reportaron efectos teratógenicos y embriotóxicos (*Islam et al. 1994*). En otro estudio se reporta una reducción de un 30% en la proliferación de linfocitos humanos tratados *in vitro* con anfetaminas (*Gagnon et al. 1992*) y recientemente se pone en evidencia la inducción de apoptosis en neuronas de rata y ratón (*Stumm et al. 1999, Demiglio et al. 2000 y Landenheim et*

al. 2000). También se ha reportado que la exposición a anfetamina produce edema y daño en pulmón de rata, el cual se previene con la adición de dimetiltiourea, un protector contra radicales de oxígeno (*Huang et al. 2002*).

No obstante los potentes efectos ejercidos, las intoxicaciones mortales por anfetamínicos son raras. La muerte sobreviene por medio de un cuadro de hiperpirexia, convulsiones, coma y hemorragia cerebral. La dosis letal para el hombre varía grandemente en relación con las características individuales y a la eventual habituación y es de alrededor de 20-25 mg/kg de peso corporal.

El estudio en humanos se ve dificultado para este tipo de drogas por consideraciones éticas y legales, las alternativas para su estudio en humanos han sido individuos que las consumen habitualmente, o que están en rehabilitación. Otra alternativa es estudiarlas en células extraídas de sujetos sanos y realizar pruebas in vitro, un buen modelo son los linfocitos aislados de sangre periférica.

3.2.3. INTERFERENTES DE ANFETAMINAS

La mayoría de los remedios para el resfriado y los supresores de apetito contienen sustancias que pueden tener reactividad cruzada con los reactivos utilizados para el análisis de anfetaminas, químicamente tienen características similares y están consideradas como una familia de drogas llamadas aminas simpatomiméticas.

Aminas Simpatomiméticas

- Cloroprenalina
- Efedrina
- Etafedrina
- Isoetarina
- Isopenalina
- Metoxifenamina
- Metilefedrina
- Fenilpropalamina

Estas aminas simpatomiméticas dan un resultado presuntivo positivo en la orina. Algunos fármacos que se venden sin receta médica utilizados para auto-medicación pueden interferir en

los inmunoensayos ocasionando resultados positivos como son los antihistamínicos. A pesar de que los métodos están diseñados para minimizar problemas, algunos métodos reaccionan con un gran número de medicamentos de consumo común (Cody 1990). Por ello es necesario realizar la prueba confirmatoria por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*Federal Register 1994*).

3.3 TOXICOLOGÍA

Con la revolución industrial y agrícola del siglo XX y la aplicación de nuevas tecnologías con finalidades muy diversas, tales como producción vegetal, industria química, producción de energía, medicina, etc., ha ido aumentando la presencia de agentes físicos y químicos, producidos por las distintas actividades humanas. Se ha demostrado, especialmente a partir de la década de 1940, que un número considerable de estos agentes son capaces de producir efectos perjudiciales sobre los seres vivos.

Una de las ramas de la medicina que estudia los efectos de las toxinas o venenos vegetales, animales y minerales es la toxicología. Esta disciplina normalmente es considerada una vertiente de la farmacología o de la medicina legal. La palabra “toxikon” procede del griego y significa veneno de las flechas usadas en cacería desde la antigüedad. Las puntas de las flechas se preparaban con material contaminado con bacterias, por ejemplo con pedazos de cadáveres o venenos vegetales, con la intención de acelerar la muerte de los animales. Como venenos vegetales se utilizaban plantas que provocaban inflamaciones, que lesionaban el corazón o paralizaban los músculos o la respiración. Por lo tanto la toxicología es el estudio de los efectos nocivos causados por los agentes ambientales a los seres vivos.

Para determinar la toxicidad de una sustancia es necesario establecer la cantidad o concentración a la cual esa sustancia puede ser peligrosa para un organismo. Algunas sustancias tienen en concentraciones bajas un efecto positivo sobre el cuerpo y se vuelven peligrosas cuando se toman en mayor concentración.

Muchas sustancias consideradas venenosas son tóxicas de forma indirecta. Un ejemplo es el metanol que no es venenoso por sí mismo, sino cuando se convierte en el hígado en formaldehído. Otro ejemplo es el acetaminofeno o paracetamol, el cual especialmente en presencia de alcohol se vuelve tóxico. Estos efectos nocivos son debidos a la inducción o inhibición de enzimas que los metabolizan. Otro factor que va cobrando relevancia en los últimos

años es la variabilidad genética que predispone a que los individuos transformen de manera diferente los tóxicos.

3.4. TOXICOLOGÍA GENÉTICA

La Toxicología Genética, que puede ser considerada como una especialidad de la Genética o de la Toxicología, ha adquirido un papel cada vez más relevante, dado que se ocupa fundamentalmente de la identificación y el análisis de la acción de cualquier agente físico, químico o biológico, que sea capaz de ejercer efectos tóxicos sobre el material genético de los seres vivos.

Conviene destacar que, si bien muchos agentes tóxicos dañan el material genético una vez alcanzado un nivel que produce muerte y toxicidad generalizada, el objetivo primario de la Toxicología Genética es detectar y estudiar las propiedades y los mecanismos de acción de aquellos agentes que son altamente específicos para los ácidos nucleicos. El interés de los estudios de Toxicología Genética se centra principalmente en los agentes cuyos efectos nocivos sobre el material genético se producen a niveles de exposición que no se consideran tóxicos o que, a lo sumo pueden ser clasificados como subtóxicos. En base a ello, se denomina agente genotóxico a aquel que produzca cualquier tipo de daño genético a dosis subtóxicas. La Comisión Internacional para la Protección contra los Mutágenos y Carcinógenos Ambientales (*ICPEMC.*, 1983) estableció que el término genotóxico se debe de utilizar para aquellos agentes que tienen afinidad para interaccionar con el ADN.

Desde que Ames en 1979, utilizando el ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, identificó un buen número de contaminantes químicos ambientales, capaces de causar mutaciones en organismos procariontes y cáncer en mamíferos (*Ames 1979*), y que el grupo de investigación dirigido por Barbacid demostró en 1982 que una mutación puntual era la responsable de que el oncogén T24, implicado en el cáncer de vejiga en humanos, adquiriese su capacidad transformadora (*Reddy et al., 1982*), se han ido acumulando múltiples evidencias experimentales y epidemiológicas que demuestran de manera inequívoca que el daño genético no sólo es la base de los eventos mutagénicos, sino que también en el desarrollo de un proceso cancerígeno ocurren una serie de mutaciones, tanto a nivel de los genes tumorales u oncogenes, como a nivel de los genes supresores de tumores.

Además de la importancia intrínseca de investigar las bases moleculares y cromosómicas de la genotoxicidad, la mutagenicidad y la carcinogenicidad, así como sus mecanismos y sus

consecuencias, cada vez es más necesario establecer de forma precisa las relaciones de causalidad existentes entre la inducción de daño genético, la fijación del mismo en forma de mutación germinal o mutación somática y la génesis de un proceso cancerígeno.

Un gran número de productos químicos, tanto naturales como sintéticos, así como las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta, distintos virus y microorganismos, pueden provocar alteraciones genéticas en las células y en los organismos. Si las células afectadas pertenecen a la línea germinal o reproductora, pueden llegar a producirse malformaciones hereditarias. Si las células afectadas son células somáticas, las mutaciones pueden conducir a cáncer, envejecimiento y enfermedades cronicodegenerativas. Los agentes potencialmente mutagénicos pueden ejercer su acción nociva durante el desarrollo embrionario, produciendo alteraciones más o menos graves en el curso del desarrollo normal. Aunque en la mayoría de los casos, la teratogénesis no tiene una base genética, existen agentes mutagénicos con acción teratogénica.

A lo largo de la segunda mitad del siglo XX se han ido acumulando evidencias que demuestran que la aparición creciente de productos de todo tipo (industrial, alimenticio, farmacológico, etc.), o de subproductos y residuos contaminantes, representan un riesgo, ya que en su mayoría las mutaciones inducidas resultan deletéreas.

Dada la importancia de las consecuencias adversas que los agentes genotóxicos ejercen sobre los seres vivos y dada la relación entre toxicidad genética, mutación, cáncer y otras enfermedades, la Toxicología Genética desempeña un papel relevante no sólo en su faceta de ciencia básica, sino también en el campo de su aplicación y en la utilización de sus conocimientos con fines preventivos y para mejorar la salud pública. Sin lugar a dudas, los avances en la Toxicología Genética han contribuido y contribuirán a que se tome conciencia de la importancia de preservar nuestro patrimonio genético y reducir al máximo el riesgo que supone para cualquier ser vivo en general, y para el hombre, en particular, la exposición a posibles agentes mutagénicos y/o carcinogénicos.

En este punto conviene señalar que muchas veces, antes de que se desarrolle, por ejemplo, un determinado tipo de cáncer inducido por un agente externo, con las metodologías citogenéticas, moleculares y bioquímicas disponibles en la actualidad se pueden detectar alteraciones que nos sirvan de señal de alarma, con lo cual se pueden tomar todas las medidas oportunas para evitar el riesgo para la salud. También hoy sabemos que determinadas personas que presentan ciertas enfermedades de tipo genético (ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, xeroderma pigmentosum, etc.) son mucho más sensibles a la acción genotóxica de distintos agentes

mutagénicos/cancerígenos, por lo que en estos casos de una mayor susceptibilidad hay que extremar al máximo las medidas de precaución y evitar los distintos tipos de exposición que constituyan factores de riesgo.

3.5. GENOTOXICIDAD

3.5.1. Alteraciones del ADN que implican efectos genotóxicos

La replicación del ADN no es un proceso totalmente perfecto. Se producen cambios genéticos espontáneos con bajas frecuencias, tanto a nivel nucleotídico como a nivel cromosómico. La selección natural opera eliminando o manteniendo estos cambios, dependiendo de su naturaleza. No todas las mutaciones son deletéreas y bajo determinadas condiciones o ambientes, algunas mutaciones pueden ser consideradas como neutras e incluso, como benéficas.

La constitución genética de los distintos seres vivos ha ido evolucionando, llegando a alcanzar un delicado equilibrio. Por lo tanto, la inducción de cambios genéticos, incluso la de aquellos que a priori podemos considerar poco importantes, cuando ocurren en sistemas complejos pueden conducir a anomalías, malformaciones, enfermedades y muerte. Aunque la evolución dependa de la mutación para generar variabilidad en las poblaciones, lo cierto es que demasiados cambios genéticos en un período de tiempo corto pueden reducir de manera significativa la viabilidad y la eficacia biológica de las distintas especies, incluida la nuestra.

En principio, podemos clasificar el daño genético en dos grandes categorías: los efectos detectables mediante el análisis citológico de los cromosomas (macrolesiones) y los cambios que ocurren a nivel nucleotídico (microlesiones). Los cambios de una purina por otra purina o los de una pirimidina por otra, son sustituciones que se denominan transiciones. Cuando una base es sustituida por otra de distinto tipo, entonces los cambios se llaman transversiones. Tanto las transiciones como las transversiones son cambios de tipo cualitativo. Las adiciones producen mutaciones por desplazamiento del marco de lectura ("frameshift"). Las macrolesiones comprenden los cambios que afectan al número o a la estructura de los cromosomas.

En la mayoría de los estudios citogenéticos, el análisis cromosómico se realiza en la metafase mitótica. Clásicamente, las aberraciones cromosómicas comprenden cambios estructurales que se clasifican según el momento en que se originan durante el ciclo celular. Si nos referimos a

primera metafase (M1), los tipos de aberraciones normalmente observadas en la fase G1 son: roturas cromosómicas, anillos, translocaciones, deleciones, dicéntricos y fragmentos acéntricos; en la fase G2 son: roturas cromatídicas, cuadrirradiales, trirradiales y fragmentos; en la fase S encontramos una mezcla de las aberraciones señaladas.

La fase S es la más sensible a la acción de los agentes genotóxicos, la fase G2 presenta una sensibilidad moderada y la fase G1 y la mitosis son en general menos sensibles a los efectos genotóxicos. Cuando el análisis citogenético se lleva a cabo en M2 o M3, entonces los distintos tipos de aberraciones aparecen mezclados y, por consiguiente, se pierde la relación con cada estadio celular.

De lo anteriormente señalado se desprende que el conocimiento del ciclo celular es esencial, sobre todo en el caso de las células de mamíferos que presentan distintos estadios bien diferenciados. Este aspecto es de enorme importancia en la realización y evaluación de diversos ensayos utilizados en toxicología genética, en particular de los que miden la síntesis de ADN fuera de la fase S (unscheduled DNA synthesis, UDS), intercambios entre cromátidas hermanas (SCE), micronúcleos (MN), y otras anomalías cromosómicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Preston et al., 1981).

De las diferentes etapas de la mitosis, la metafase es la que se emplea normalmente en el análisis citogenético para la evaluación de reordenaciones y roturas cromosómicas. Se suele utilizar la colchicina para detener las células en metafase y así facilitar la observación. La anafase también se ha utilizado para detectar aberraciones cromosómicas, pero las reorganizaciones cromosómicas son más difíciles de interpretar y, por lo tanto, el uso de esta fase es relativamente poco frecuente.

Por lo que se refiere a los posibles efectos genotóxicos en las células germinales, el conocimiento del proceso de la meiosis es de gran importancia, sobre todo cuando se llevan a cabo ensayos *in vivo* como los utilizados para detectar la inducción de mutaciones letales dominantes y de translocaciones heredables. Es esencial conocer el tiempo necesario para que una dotación cromosómica pase del estadio inicial de la meiosis (células gonadales) a la formación de espermatozoides y óvulos maduros, listos para participar en el proceso reproductivo, ya que actualmente se sabe que las exposiciones agudas a determinados agentes mutagénicos pueden producir efectos específicos dependiendo del estadio de las células germinales.

Otro aspecto a señalar es que, mientras que el espermatozoides es producido y eliminado de manera continua, las células germinales femeninas permanecen como oocitos primarios hasta antes de la ovulación. De esta manera, los gametos de hembras de los mamíferos pueden sufrir múltiples exposiciones in situ antes de ser liberados. En general, los oocitos suelen ser menos sensibles a los efectos de los productos químicos que los espermatozoides y resulta difícil poder discriminar entre los efectos citotóxicos que dañan el proceso de la ovulación y los efectos genéticos que originan la falta de implantación.

Las alteraciones estructurales dependen de la capacidad clastogénica de los agentes genotóxicos, es decir de la capacidad de producir roturas. En general, la mayoría de mutágenos que originan mutaciones por sustitución de bases o los que se intercalan produciendo mutaciones por cambio de la pauta de lectura, no suelen ser clastógenos eficientes. En cambio, los agentes químicos alquilantes bi- y polifuncionales son típicos clastógenos.

3.5.1.1. Tipos de mutaciones en la molécula de ADN

Existen cambios que pueden ocurrir de una manera espontánea, originando distintos tipos de mutaciones. De acuerdo con un criterio morfológico, además de las mutaciones puntuales (transiciones y transversiones) pueden producirse daños que afectan más de una base como son las deleciones, inserciones, o de expansión de repeticiones de tripletes. Desde un punto de vista funcional, podemos distinguir las siguientes mutaciones:

a) Silenciosas. No se observa ningún efecto fenotípico. En general, corresponden a cambios de bases en regiones no codificadoras que tampoco contienen secuencias reguladoras, por ejemplo en ADN satélite, en minisatélite, en retrotransposones, etc.

b) De cambio de marco de lectura. En este caso se produce un cambio en el marco de lectura de los tripletes, por la pérdida o la adición de una o dos bases (o múltiplos de dos). Dado que el efecto de la deleción de una base puede ser compensado por la inserción de otra (y viceversa), existen mutaciones que revierten parcialmente el efecto del cambio de pauta.

c) Sin sentido. Se deben al cambio de una base que hace que un triplete codificante se transforme en uno sin sentido, que determina la interrupción de la síntesis proteínica.

d) De cambio de sentido. Limitado a un triplete; son las sustituciones.

e) De elementos de control. Corresponden a mutaciones que afectan secuencias reguladoras, tales como un promotor o un intensificador.

f) De expansión de repetición de tripletes. Este tipo de mutación ha sido reconocido en los últimos años como un factor implicado en varias enfermedades hereditarias humanas (Bates et al., 1994).

En todos los tipos de mutaciones indicadas, el error en la secuencia de ADN debe ser autorreproducible en cada división celular. De lo contrario, quedaría restringido a la célula en la que se produjo la alteración, la cual podría además morir sin ninguna consecuencia negativa para un organismo pluricelular. Las mutaciones pueden darse tanto en las células germinales como en células no germinales o somáticas, con capacidad para formar clones. Estas mutaciones somáticas cada vez son más importantes en medicina, dado su papel en la génesis de una serie de enfermedades.

3.5.1.2. Origen de las mutaciones espontáneas

Las mutaciones espontáneas se deben fundamentalmente a errores durante la replicación del ADN. Estas mutaciones pueden ser promovidas por la propia inestabilidad química de la molécula de ADN. Así, pueden ocurrir por el cambio espontáneo de una conformación química de una base (formas tautoméricas), por la pérdida de bases púricas (despurinización del ADN que se ve influenciada por un pH bajo) y otros mecanismos, como pueden ser la movilización espontánea de elementos transponibles.

Además de los errores derivados de la replicación, hay que tener en cuenta los errores en la reparación y en la incorporación de bases modificadas que presenten propiedades ambiguas de apareamiento. Además de la despurinización, anteriormente definida, existen como mínimo tres procesos endógenos que también contribuyen de manera significativa a la mutagénesis espontánea. Estos procesos son: la oxidación, la metilación y la desaminación. Todos ellos están implicados en distintas vías mutacionales, algunas de ellas importantes en diversos desórdenes genéticos y cáncer en humanos.

En las sustancias orgánicas, hay muchos compuestos que teniendo la misma composición (o sea, la misma fórmula empírica), presentan propiedades físicas y químicas diferentes, que pueden ser debidas a la presencia de grupos funcionales diferentes. Los tautómeros de la timina y la guanina

son sus formas enólicas, mientras que los tautómeros de la adenina y la citosina son las formas imino. La tautomería, al cambiar la distribución espacial de los electrones de las moléculas, posibilita el apareamiento complementario entre bases distinto de la normal. Así, la forma tautomérica de T (T*) apareará con G; la de G (G*) con T; la de A (A*) con C, y la de C (C*) con A. Estas formas tautoméricas raras pueden encontrarse en una proporción aproximada de 1 en 10⁴ con respecto a la forma usual; y si se encuentran en el momento de la replicación, se introduce un cambio mutacional por sustitución de bases. Los apareamientos incorrectos de isómeros y tautómeros dan lugar a transiciones y en algunos casos también a transversiones (*Lewin 2000*).

Los errores en la selección de los desoxirribonucleótidos (dNTP), en su incorporación y en el proceso de corrección de pruebas "proof-reading", también contribuyen a la mutación. Las reacciones de polimerización, en circunstancias de perturbación, pueden incorporar bases mediante mecanismos que no dependen de la buena formación de puentes de hidrógeno. Se pueden incorporar purinas en sitios apurínicos o apirimidínicos. A pesar de la carencia de puentes de hidrógeno en estos sitios, los estudios mediante resonancia magnética nuclear (RMN) indican que la configuración de la molécula de ADN sigue siendo la forma biológicamente activa (B).

Otros dos mecanismos están también implicados en la mutación espontánea: la supresión intergénica y las mutaciones mutadoras y antimutadoras. La supresión intergénica consiste en la restauración de la función de un gen mutado mediante cambios en otro gen, llamado supresor. Los genes supresores pueden restaurar la lectura correcta de las mutaciones sin sentido, con sentido incorrecto y de cambio de la pauta de lectura.

Las mutaciones mutadoras y antimutadoras causan aumento o disminución de la tasa global de mutación por célula, respectivamente. Normalmente se trata de mutaciones de la ADN polimerasa, que no sólo añade nucleótidos en el sentido 5'--3', sino que también actúa como exonucleasa en sentido 3'--5' corrigiendo. Las mutaciones pueden implicar cambios en la capacidad correctora. En la actualidad se conocen mutantes antimutadores muy eficaces, que presentan una elevada función correctora en relación a la actividad polimerizadora.

3.5.1.3. Lesiones debidas a la acción de agentes físicos y químicos

Distintos agentes físicos y químicos son capaces de producir lesiones en el ADN y si estas lesiones no son reparadas, convertirse en mutaciones. El primer agente mutagénico conocido fueron los rayos X, se demostró que incrementaban la frecuencia de mutaciones en *Drosophila*

melanogaster, de diez a cien veces sobre la frecuencia de mutación espontánea. En seguida se comprobó que todas las radiaciones ionizantes, como los rayos X, alfa, beta, gamma, etc., son agentes mutagénicos en todos los organismos, desde los procariotas hasta el hombre. La formación de pares iónicos conduce a la producción de radicales libres altamente reactivos, pudiéndose generar transformaciones químicas. Las radiaciones ionizantes son capaces de inducir tanto mutaciones génicas como cromosómicas y en general su efecto es acumulativo.

La luz ultravioleta es una radiación no ionizante que también produce mutaciones, siendo su efecto más característico la formación de un dímero entre dos pirimidinas adyacentes. Esta dimerización produce una distorsión local en la cadena afectada, de modo que al replicarse, la ADN polimerasa se detiene, lo que tiene consecuencias letales al impedirse la replicación, o se puede originar una delección en la cadena de nueva síntesis.

Por lo que respecta a los agentes químicos, los primeros mutágenos químicos que se descubrieron fueron el gas mostaza y sus derivados. Otros mutágenos bien estudiados son los análogos de base, que tienen diferentes propiedades de apareamiento que las bases a las que pueden sustituir, y que también pueden sufrir cambios tautoméricos.

Existen numerosos agentes químicos que son capaces de modificar los nucleótidos, ya sea causando cambios tautoméricos, desaminaciones o añadiendo radicales alquílicos como el metilo, el etilo, etc., en las bases. Debido a estas modificaciones, se alteran las propiedades químicas de las bases y se producen cambios en los apareamientos. Los agentes intercalantes suelen ser moléculas que tienen tres anillos planos de dimensiones similares a un par de bases, por lo que tienen la capacidad de colocarse entre pares de bases consecutivas, desplazándolas ligeramente. Debido a las distorsiones que se producen en las hebras, durante la replicación se pueden originar delecciones y adiciones.

Es importante señalar que, independientemente del tipo de agente mutagénico de que se trate, las mutaciones se producen al azar. Es decir, aunque un agente tenga un mecanismo de acción determinado, el nucleótido afectado puede estar en cualquier posición.

3.5.2 Ensayos para evaluar citotoxicidad, genotoxicidad y daño al ADN .

3.5.2.1. Ensayo de FDA/BrEt para evaluar la citotoxicidad.

Dentro de los estudios realizados para la valoración de la viabilidad celular se encuentra el denominado ensayo de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/BrEt.), el cual nos permite evaluar el efecto citotóxico de los compuestos utilizados, mediante una tinción dual FDA/BrEt (Diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio), los cuales se emplean para evidenciar la integridad nuclear de la célula y la actividad metabólica de los lisosomas y mitocondrias. Las células viables son capaces de metabolizar el FDA y adoptar el color verde fluorescente del reactivo de FDA; mientras que las células no viables permiten el paso del BrEt a través de la membrana nuclear, fijándose a las cadenas de DNA y dando como resultado un color rojo.

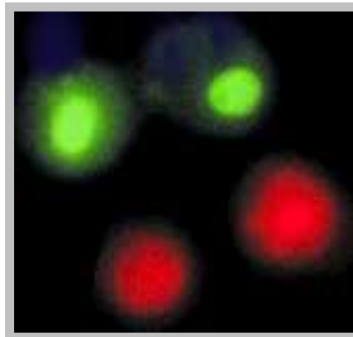


Figura B.- Ensayo de viabilidad celular mediante FDA/BrEt

3.5.2.2. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos ha surgido como uno de los métodos preferidos para evaluar daño cromosómico y genotoxicidad. Un micronúcleo es un fragmento de material genético que se separa del núcleo formando una estructura independiente observable a nivel microscópico, el cual mediante marcaje con sondas específicas se ha asociado a la pérdida y rompimiento de cromosomas.

Dado que los micronúcleos sólo se observan después de que las células han completado la división nuclear, se desarrolló una técnica que facilita la observación y detección de los micronúcleos; en ésta se bloquea la citocinesis (CBMN) al agregar un inhibidor del ensamblaje de los microfilamentos lo que evita la separación citoplásmica de las células que se dividen, las cuales

son fácilmente identificadas por su apariencia binucleada. El método es actualmente aplicado a varios tipos de células para evaluación de daño genético en poblaciones, para la evaluación de sustancias químicas con potencial genotóxico, en la predicción de la radiosensibilidad de tumores y la variación interindividual en radiosensibilidad (Fenech 2000).

El CBMN proporciona mediante criterios morfológicos sencillos mediciones de genotoxicidad y citotoxicidad. También permite determinar rompimientos o pérdida de cromosomas, rearrreglos (puentes nucleoplásmicos), necrosis y apoptosis.

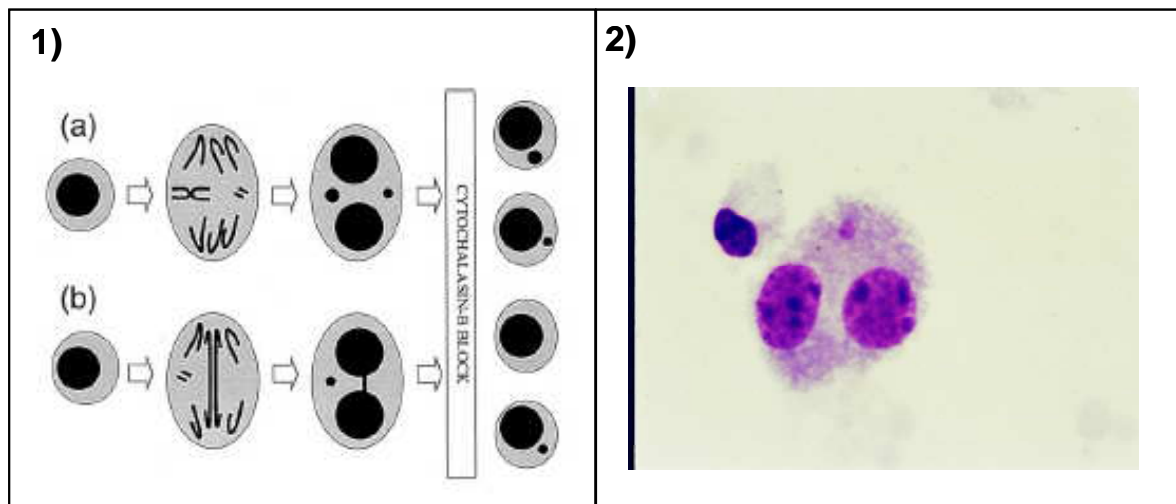


Figura C.- Formación de micronúcleos. 1) Mecanismo propuesto por Fenech 2) Foto de una célula binucleada con un micronúcleo

3.5.2.2. Ensayo cometa o técnica de electroforesis unicelular.

En 1988 se empezó a utilizar ampliamente la técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa, que detecta el daño a nivel de ADN. Esta técnica se ha utilizado en una gran variedad de células de mamíferos tanto en estudios in vivo como in vitro detectando rompimientos en el ADN inducidos por una gran variedad de agentes. También se utiliza para el biomonitorio de poblaciones humanas, como lo muestran los trabajos de genotoxicidad de pentaóxido de vanadio (Rojas et al, 1996), el de exposición a contaminantes en el aire de la ciudad de México (Valverde et. al., 1997), así como estudios en poblaciones susceptibles a daños ocasionados por agentes oxidantes, radiación ionizante y radiación ultra-violeta (Rojas et al, 1999). Además, su aplicación se extiende al análisis de productos biotecnológicos para el estudio de peces y gusanos terrestres expuestos a contaminación ambiental (Tice et. al., 1995).

El ensayo cometa es una técnica sensible para detectar rompimientos de cadena sencilla en el DNA (por cada 10 daltones), evalúa sitios álcali lábiles o rompimientos de doble cadena en el DNA dependiendo del pH; permite cuantificar la extensión del daño al DNA en células individuales, lo que puede indicar un efecto a nivel de subpoblaciones celulares en el mismo individuo (Tice, 1995).

Una contribución importante de la técnica en el campo de la toxicología es la posibilidad de aplicarla en estudios in vivo, puesto que se requiere de un pequeño número de células y puede emplearse en prácticamente cualquier órgano o tejido, incluyendo sangre, médula, cerebro, mucosa gastrointestinal, riñón, hígado, pulmón, mucosa nasal, ovarios, piel, bazo y testículo (Tice, 1995).



Figura D.- Tipos de daño observados al microscopia mediante el ensayo cometa o técnica de electroforesis unicelular

3.6 TOXICOGENOMICA

El conocimiento de la secuencia del genoma humano ha dado lugar al surgimiento de diferentes disciplinas integrales, una de ellas se denomina toxicogenómica, la cual está elucidando y relacionando los componentes hereditarios con la toxicología de fármacos y xenobioticos, proveyendo así las bases científicas para optimizar la terapéutica en función de la constitución genética de cada paciente minimizando el riesgo de toxicidad. Las diferentes respuestas en la eficacia y toxicidad de diversos xenobióticos y medicamentos se deben en gran parte a polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan los diversos fármacos. Entre estas, una de las enzimas más estudiada es la producida por el gen *CYP2D6*, el cual codifica para una enzima perteneciente al citocromo P450. *CYP2D6* se encarga de metabolizar alrededor del 20 % de los fármacos más utilizados en la terapéutica y el gen que la codifica presenta más de 70 diferentes polimorfismos, algunos inclusive específicos de raza o de ciertas poblaciones. Los conocimientos que se han adquirido acerca de *CYP2D6*, permiten entender la variabilidad en la respuesta a los tratamientos con antiarrítmicos, antidepresivos, analgésicos, antipsicóticos, anticonvulsivos y antihistamínicos (*Ingelman-Sundberg 2005*).

La heterogeneidad en la respuesta de los pacientes a los medicamentos tiene impacto en la eficacia del tratamiento, en los efectos colaterales y en la toxicidad. Como causas potenciales de la respuesta individual, se han considerado diferentes factores entre los que cabe mencionar: la edad, el sexo, el estado nutricional, las funciones renal y hepática, la patogénesis y severidad de las enfermedades, así como las interacciones con otros fármacos y enfermedades concomitantes. La revolución en el conocimiento del genoma humano está demostrando que las diferencias heredadas en los genes involucrados en la farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos, tienen una influencia determinante en la eficacia y toxicidad de los mismos. Lo que se está poniendo en evidencia es que así como tenemos un juego único de huellas digitales, cada uno de nosotros tiene una combinación única de genes que nos hace resistentes o sensibles a los efectos de los medicamentos y a otros factores químicos, físicos y biológicos a los que estamos expuestos. Los polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas encargadas del metabolismo, transporte, recepción y apertura de canales iónicos pueden alterar la eficacia del tratamiento en determinado individuo o afectar el riesgo de que se presente una reacción adversa a cierto grupo de medicamentos.

Aproximadamente el 40 % del metabolismo en el organismo es llevado a cabo por el citocromo P450. Los genes que sintetizan las enzimas que forman parte del citocromo P450 contienen variaciones en las secuencias en el ADN, conocidos como polimorfismos, los cuales pueden

causar inactivación parcial o total de la actividad enzimática, con efectos cuantitativos y cualitativos en el metabolismo de los mismos.

3.7 CITOCROMO P450

En los últimos años el CYP450 ha sido ampliamente investigado. Es curioso y paradójico que no sea en término estricto un citocromo, ni una entidad sencilla, sino una vasta familia de enzimas hemotiolato con propiedades oxido reductoras conocidas como monooxigenasas, debido a su habilidad para activar el oxígeno molecular en especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), y entonces incorporar el oxígeno a una amplia variedad de sustratos. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en los cinco reinos (*Lewis 2000, Nebert et.al 1989*).

En 1989 se propuso una forma sistemática de nombrar a los integrantes de la familia de P450. Usando el símbolo CYP como abreviatura de citocromo P450, el cual se escribe en itálicas cuando se refiere al gen (*CYP*) y en letra normal cuando es la proteína (*CYP*), posteriormente se le agrega un número que corresponde a la familia, donde de manera general se asume que entre familias la identidad y homología estructural debe ser menor o igual al 40%, después se coloca una letra que corresponde a la subfamilia y en subfamilias esta homología debe ser superior al 40 %, posteriormente se agrega un número que corresponde a la isoenzima, y por último un asterisco seguido de un número que nos describe la variedad alélica (*Nebert 1989*). Aunque este sistema fue inicialmente arbitrario se ha adaptado satisfactoriamente a la mayoría de los casos.

El número de genes P450 conocidos son subdivididos en 15 familias en mamíferos, 30 familias en plantas, 50 familias en bacterias, 16 familias en hongos, 7 familias en insectos, 2 familias en moluscos y 12 familias en nematodos (*Lewis 2001*).

Los sustratos y reacciones de las enzimas que forman parte del CYP450 son muy variados, metabolizan: 1.- sustratos endógenos, introduciendo cambios oxidativos, peroxidativos y reductivos en moléculas pequeñas de una gran diversidad, como por ejemplo: los ácidos grasos, los esteroides, las vitaminas y los ácidos biliares. 2.- sustratos exógenos como son los medicamentos, contaminantes ambientales y productos naturales. Se considera que la mayoría de los xenobióticos son eliminados por el proceso metabólico llevado a cabo por el CYP450, sin embargo el proceso también puede generar metabolitos tóxicos que contribuyen a incrementar los efectos tóxicos y el riesgo de patologías como el cáncer y los defectos al nacimiento (*Lewis 2001, Nebert et, al., 2002*).

Los humanos contamos con 57 genes de P450 pero sólo media docena son los responsables del metabolismo de la mayoría de sustancias que ingresan al organismo (*Nelson et. al., 1996*). Un estudio del metabolismo de 315 fármacos reveló que 56% de ellos fueron metabolizados mediante el citocromo-P450, siendo los más importantes: CYP3A4 (50%), CYP2D6 (20%), CYP2C9 (15%). El porcentaje restante se lleva a cabo por CYP2E1, CYP2A6 y CYP1A2 (*Bertz et. al., 1997*).

Los genes en la superfamilia de P450 son altamente polimórficos produciendo una heterogeneidad farmacogenética entre individuos, dando origen a metabolizadores lentos, intermedios, rápidos y ultrarrápidos. Alelos diferentes de uno o varios citocromos pueden ser causantes de que un medicamento no sea efectivo, de efectos tóxicos y ocasionalmente que cause la muerte. Algunos fenotipos que confieren un metabolismo muy efectivo se han asociado con un aumento en el riesgo de ciertos tipos de cáncer o de efectos tóxicos. Mutaciones en los genes del CYP450 son causantes de patologías hereditarias como son la hipercolesterolemia, la hiperplasia adrenal lipoide, la ginecomastia en hombres jóvenes y la virilización en mujeres (*Nebert et. al., 2002*).

No obstante que el hígado es el órgano que tiene principalmente la función de metabolizar xenobióticos, otros órganos han mostrado que pueden metabolizar algunas sustancias, dentro de ellos se encuentran el pulmón, el riñón y el cerebro. Las enzimas de p450 han sido caracterizadas en varios tipos de células, incluyendo las de sangre periférica, donde el linfocito exhibió el mayor número de enzimas p450 (CYP) con respecto a las otras células sanguíneas (*Raucy et al. 1999*). En el linfocito se han detectado CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP2D6 y CYP3A5. Aunque la presencia de estos CYP sugiere actividad enzimática, pocas han sido las sustancias cuyo metabolismo ha sido evaluado en los linfocitos (*Raucy et al. 1999*). En el caso del CYP2D6 se ha detectado la expresión de ARNm en linfocitos y se propone que correlaciona con la actividad enzimática para la hidroxilación de debrisoquina (*Carcillo et al. 1996*).

3.7.1 CITOCROMO P450 2D6

El *CYP2D6* interviene en el metabolismo de un 20% de los medicamentos utilizados. Básicamente hidroxila alrededor de 75 fármacos que se prescriben comercialmente (*tabla B*). También está involucrado en el metabolismo de contaminantes laborales y ambientales o ingeridos en la dieta. El gen *CYP2D6* se localiza en el cromosoma 22 (*Gonzalez et. al., 1988, Eichelbaum et. al., 1987*) en la posición 22q13.1 (*Gough et. al., 1993*). La proteína se expresa en varios tejidos incluyendo hígado, riñón, cerebro, placenta, mama y pulmón (*Niznik et. al., 1990, Romkes et. al., 1994,*

Carcillo et. al., 1996, Hakkola et. al., 1996, Guidice et. al., 1997, Huang et. al., 1997). Se considera que la clonación y caracterización del *CYP2D6* (*Gonzalez et. al., 1988*) fue un logro clave que dió inicio a la farmacogenética molecular.

El locus donde se localiza el gen silvestre de *CYP2D6* en seres humanos esta constituido por tres genes altamente homólogos, *CYP2D8P*, *CYP2D7P* y *CYP2D6*, los cuales se localizan en orientación (5' – 3') en región contigua (*Kimura et.al, 1989, Heim et.al., 1992*). Los genes *CYP2D* constan de nueve exones y ocho intrones. El gen *CYP2D8P* es un pseudogen que contiene multiples deleciones e inserciones que causan efectos en la transcripción y posiblemente en la traducción no existiendo producción de la enzima, el principal es una disrupción del marco de lectura (*Kimura et.al, 1989, Heim et.al., 1992*). El gen *CYP2D7P* es más similar al gen *CYP2D6* que al *CYP2D8P* y su secuencia codificante indica sólo una mutación inactivante sencilla, una inserción de T226 en el primer exón. Sin embargo ningún producto de RNA mensajero se detectó en hígado de ocho individuos, lo que indicó que se trataba también de un pseudogen. Otros trabajos confirmaron esta mutación en T226 (*Heim et.al., 1992, Hanioka et. Al., 1990, Johansson et.al 1994*). En contraste en ratas seis isoformas han sido identificados para este gen (*Kawashima et.al., 1995. Nelson et.al., 1996, Hiroi et.al., 2002*).

TABLA B

Antiarrítmicos	Quinidina, disopiramida, procainamida, mexiletina, encainida, fecainida, propafenona.
<i>Antidepresivos</i>	Bupropion, maprotiline, trazodona, amitriptilina, amoxapina, clomipramina, desipramina, doxepin, imipramina, nortriptalina, protriptilina, trimipramina, fluoxetina, nefazodona, paroxetina, sertralina, venlafaxina.
<i>Analgésicos</i>	Codeina, hidrocodona, dihidrocodeina, propoxifeno, tramadol.
<i>Antipsicóticos</i>	Proclorperazina, prometacina, clorpromacina, tioridazina, risperidona, haloperidol.
<i>Anticonvulsivos</i>	Carbamazepina, fenitoina, gabapentina.
<i>Antihistamínicos</i>	Loratadina.
<i>Antihipertensivos</i>	Metoprolol, pindolol, propanolol, timolol, debrisoquina.
<i>Estimulantes</i>	Metanfetamina, anfetamina.
<i>Otros</i>	Cimetidina, metoclopramida, dextrometorfano, capsaicina.

El descubrimiento de los polimorfismos de CYP2D6 se describe como un evento de serendipía cuando un individuo al tomar una dosis de prueba de debrisoquina (el cual es un fármaco bloqueador adrenérgico usado para el tratamiento de la hipertensión), sufrió un colapso con hipotensión vascular. Estudios en este individuo demostraron que los efectos observados se debían a que era un metabolizador deficiente que tenía un polimorfismo en el gen *CYP2D6* que producía una enzima defectuosa en la hidroxilación y como consecuencia el metabolismo lento de la debrisoquina (*Mahgoub et. al., 1977*). Se ha demostrado una amplia variación individual en la respuesta hipotensora a este fármaco, así como una mayor sensibilidad a los efectos antihipertensivos de la debrisoquina como consecuencia del metabolismo lento (*Idle et. al., 1978*). Para evaluar el tipo de metabolismo se utilizó la relación de debrisoquina y 4-hidroxidebrisoquina presente en la orina después de la ingesta de una dosis oral única de 10 mg de debrisoquina. Dicha relación en la población estudiada se distribuyó como dos campanas sobrelapadas y aproximadamente el 3% de los individuos resultaron no metabolizadores (*Dahl et. al., 1995*). Estudios posteriores demostraron que los metabolizadores lentos tienen cantidades disminuidas del citocromo P450 tipo 2D6 (*Skoda et. al., 1988, Evans et. al., 1990*).

Algunos individuos pueden metabolizar la debrisoquina muy rápidamente, resultando en concentraciones plasmáticas subterapéuticas del fármaco a dosis normales. Este metabolismo denominado ultrarrápido, se debe a la amplificación de hasta 12 veces del gen *CYP2D6* (*Johansson et. al., 1993, Bertilsson et. al., 1993*).

3.7.1.1. VARIEDADES ALELICAS

Los primeros estudios que aportaron evidencias sobre las variaciones alélicas del gen *CYP2D6* utilizaron 20 enzimas de restricción para identificar los polimorfismos asociados al gen en individuos que tenían el fenotipo de metabolizadores lentos y rápidos (*Skoda et. al., 1988*), lo que permitió la asociación de algunos polimorfismos con el fenotipo de metabolizadores lentos (*Evans et. al., 1980*). Otros estudios fueron aportando otros polimorfismos que explicaban el fenotipo de los metabolizadores lentos (*Gaedigk et. al., 1991, Hanioka et. al., 1990, Kagimoto et. al., 1990, Gough et. al., 1990, Saxena et. al., 1994*). Mediante la valoración del genotipo en el ADN se han determinado los polimorfismos en *CYP2D6* (*Daly et. al., 1996*), el tipo de base nitrogenada que se modifica, su sitio en el ADN y el efecto que tiene en la actividad enzimática. Se han descrito más de 70 polimorfismos (<http://www.imm.ki.se/cypalleles>), el más reciente en el 2003 es el

CYP2D6*44, que presenta un defecto en el rearreglo alternativo del exon, produciendo una enzima que no es funcional (*Yamazaki et. al., 2003*).

3.7.1.2. VARIABILIDAD POBLACIONAL

Se ha estimado que la frecuencia del fenotipo de metabolizadores lentos es cerca del 9% en el Reino Unido (*Evans et. al., 1980, Armstrong et. al., 1994*), pero varía ampliamente entre grupos étnicos, siendo cerca del 1% en árabes y 30 % en chinos de Hong Kong (*Kalow et. al., 1982*). Se ha encontrado que los sujetos chinos tienen por lo menos dos veces mayor sensibilidad a los efectos de los beta bloqueadores tales como el propranolol en comparación con los caucásicos (*Zhou et. al., 1989*).

En términos de evolución y en contraste con lo sucedido en roedores, en la evolución humana tres genes en el locus han sido eliminados y dos han sido inactivados (CYP2D7P y CYP2D8P) (*Gonzalez et. al., 1990, Kimura et. al., 1989*). Un caso peculiar es el detectado en Etiopía, en donde se han encontrado alelos conteniendo múltiples copias (*Aklillu et. al., 1996*), lo que indica de acuerdo a los investigadores que lo reportaron, que la población recientemente ha sido expuesta a una presión de selección, quizás de origen alimenticio (*Ingelman-Sundberg et. al., 1999*).

Se ha reportado la existencia de varios polimorfismos en el citocromo CYP2D6 (*Tribut et al. 2002, Ingelman-Sundberg et al. 1999*). Por lo menos cinco variantes alélicas han demostrado tener consecuencias para la función enzimática de la CYP2D6, además de una frecuencia de distribución diversa en la población humana. Por ejemplo la variante alélica CYP2D6*4 produce una enzima inactiva, la CYP2D6*5 no produce la enzima, la CYP2D6*10 produce una enzima muy inestable, la CYP2D6*17 tiene una afinidad reducida por los sustratos y la CYP2D6*2xN presenta una duplicación o multiplicación del gen lo que conduce a una actividad enzimática alta.

Se han descrito más de 70 polimorfismos y la distribución relativa de variantes alélicas para el CYP2D6 difiere marcadamente entre grupos étnicos como lo muestra la siguiente figura:

				NOMBRE SISTEMÁTICO																		
				NOMBRE TRIVIAL																		
EXON	POSICIÓN ADN	MUTACION	AA	EFFECTO	1	2A	2B	9	10A	10B	17	3	4A	4B	5	6A	6B	7	8	11	12	
				W	L	C	J	Ch1	A	B	B'	D	T	E	G	F	H					
1	31	G * A	11	V * M		A																
1	100	C * T	34	P * S					A	A				A	A							
1	124	G * A	42	G * R																		F
2	883	G * C		DEFECTO DE SPLICING																		F
2	974	C * A	91	L * M										A	A							
2	984	A * G	94	H * R										A	A							
2	997	C * G		SILENCIOSA										S	S							
2	1023	C * T	107	T * I							F											
2	1039	C * T		SILENCIOSA						S												
3	1661	G * C		SILENCIOSA		S	S		S	S				S							S	S
3	1707	DEL T		MARCO DE LECTURA												F	F					
3	1758	G * T		CODON DE PARO																		F
4	1846	G * A		DEFECTO DE SPLICING										F	F							
4	1976	G * A	212	G * E													A					
5	2549	DEL A		MARCO DE LECTURA								F										
5	2613-15	DEL	281	L 281DELETADD				A														
6	2850	C * T	296	R * C		A	A				F										A	A
6	2935	A * C	324	H * P															F			
9	4180	G * C	486	S * T		A	A		A	A	A			A	A						A	A

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	NORMAL												REDUCIDA				AUSENTE			
	MULT	1	2A	2B	9	10	17	3	4	5	6	7	8	11	12					
CAUCASICOS	1	34	28	5	2	2	0	1	17	5	1.5	<1	<1	<1	<1					
ASIATICOS	2	23	20			51			1	6										
CHINOS	1	23	20			50			1											
JAPONESES	0	42	12			33				13										
KOREANOS	2	33	24			36				5										
AFRICANOS	2					4	6			2										
ETIOPIA	13					10	6		1.3	3										
ZIMBABWE							34		1.8	4										
AFROAMERICANOS	2					6	34	2	9	6										
NGAWBE *									17											
MEXICOAMERICANOS	1		23			7	1	1	10	2										

Figura E.- Principales polimorfismos de CYP2D6, posición en el gen, efecto en la proteína y actividad enzimática. Parte inferior se tabula la frecuencia poblacional para las principales variedades alélicas.

3.7.1.3. IMPORTANCIA CLINICA

Ejemplos del impacto terapéutico que tienen los polimorfismos de CYP2D6 son la resistencia ó presencia de efectos adversos producto de polimorfismos en el tratamiento de pacientes deprimidos con nortriptilina (*Dalen et. al., 1998*) y la resistencia a los efectos analgésicos de la codeína (*Tyndale et. al., 1997*). La mayoría de los pacientes deprimidos tratados con nortriptilina (90%) requieren una dosis de 75-150 mg/día para alcanzar la concentración plasmática terapéutica de 200-600 nmol/L. Los metabolizadores lentos requirieron una dosis de solo 10-20 mg/día para alcanzar el mismo nivel plasmático. Si estos metabolizadores lentos son tratados con las dosis recomendadas de 75-150 mg/día presentan efectos cardiotoxicos por dosis excesivas. En caso contrario los metabolizadores rápidos presentan resistencia al fármaco debido a que no se alcanzan las concentraciones plasmáticas necesarias. Por lo que en general, cuando no se conoce ni el fenotipo ni el genotipo del paciente, el psiquiatra sobredosifica a los metabolizadores lentos, los cuales presentaran efectos adversos e inclusive tendrán un alto riesgo de toxicidad mientras que los metabolizadores ultrarrápidos recibirán dosis menores y continuaran con otros

tratamientos por prueba y error, mientras que el paciente sigue sufriendo de depresión (*Tyndale et. al., 1997*).

Se ha encontrado que entre los pacientes tratados con medicamentos antidepresivos tricíclicos se encuentran dos tipos de pacientes que pueden presentar problemas clínicos. Los metabolizadores lentos presentan concentraciones plasmáticas incrementadas cuando son tratados con las dosis recomendadas. El otro grupo son los ultrarrápidos que presentaron un fracaso terapéutico porque las dosis serán demasiado pequeñas. Se estima que 5-20% de los pacientes pueden pertenecer a los grupos de riesgo dependiendo del grupo étnico al que pertenecen. Los efectos adversos ocurren más frecuentemente en los metabolizadores lentos y pueden ser mal interpretados y recibir erróneamente incrementos en la dosis.

El segundo ejemplo se refiere al uso de codeína como un potente analgésico, ya que es metabolizada por CYP2D6 a morfina, sin embargo los metabolizadores lentos no obtienen analgesia (*Dalen et.al., 1997*), mientras que los metabolizadores ultrarrápidos pueden tener respuestas exageradas al medicamento. Los primeros presentan una delección del gen, que también se ha encontrado que puede ser una de las causantes de la adicción a drogas opiáceas como la heroína (*Tyndale et. al., 1997*).

Se ha demostrado que CYP2D6 tiene un amplio rango de actividad en la población humana, con índices de variación en el metabolismo entre individuos que puede diferir en orden de hasta 10,000 veces (*Kroemer et. al., 1995, Nebert 1997, Sachse et. al., 1997, West et. al., 1997*). Esta variación permite vislumbrar la dificultad que conlleva el predecir la dosis, seguridad y eficacia de cada uno de los fármacos metabolizados por CYP2D6. Es por ello que al establecer las relaciones entre el genotipo (variedades alélicas) y el fenotipo (clasificación de los metabolizadores), es posible con una muestra de ADN determinar la variedad alélica de CYP2D6 y asignar así el tratamiento más apropiado para el paciente (*Eichelbaum et. al., 2001*).

Reportes en estudios realizados en ratas y en ratones indican que las anfetaminas son metabolizadas por el CYP2D6 (*Law et al. 2000, Kreth et al. 2000, Lin et al 1997*). También las evaluaciones realizadas en sistemas in vitro con microsomas hepáticos o levaduras transgénicas señalan al mismo citócromo (*Wu et al. 1997*).

3.5 EL CICLO CELULAR

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben de seguir una secuencia definida, donde el término de ciertos eventos debe preceder al comienzo de otros. Dentro del ciclo celular existen una serie de fases de vigilancia o control para asegurar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto (*Johnson et al., 1999*). Estos puntos de vigilancia están representados por cascadas de señales que involucran sensores, transmisores y efectores que se activan al presentarse en las células situaciones anormales dentro de la progresión del ciclo, como serían errores en los procesos de replicación, la falta de nutrientes o el daño al material genético entre otros. Dentro del ciclo celular encontramos diversos puntos de control como los que están en la transición de G1 a S, durante la fase de síntesis, en la fase G2 o controlando la segregación de los cromosomas durante la mitosis (*Zhou et al., 2001*).

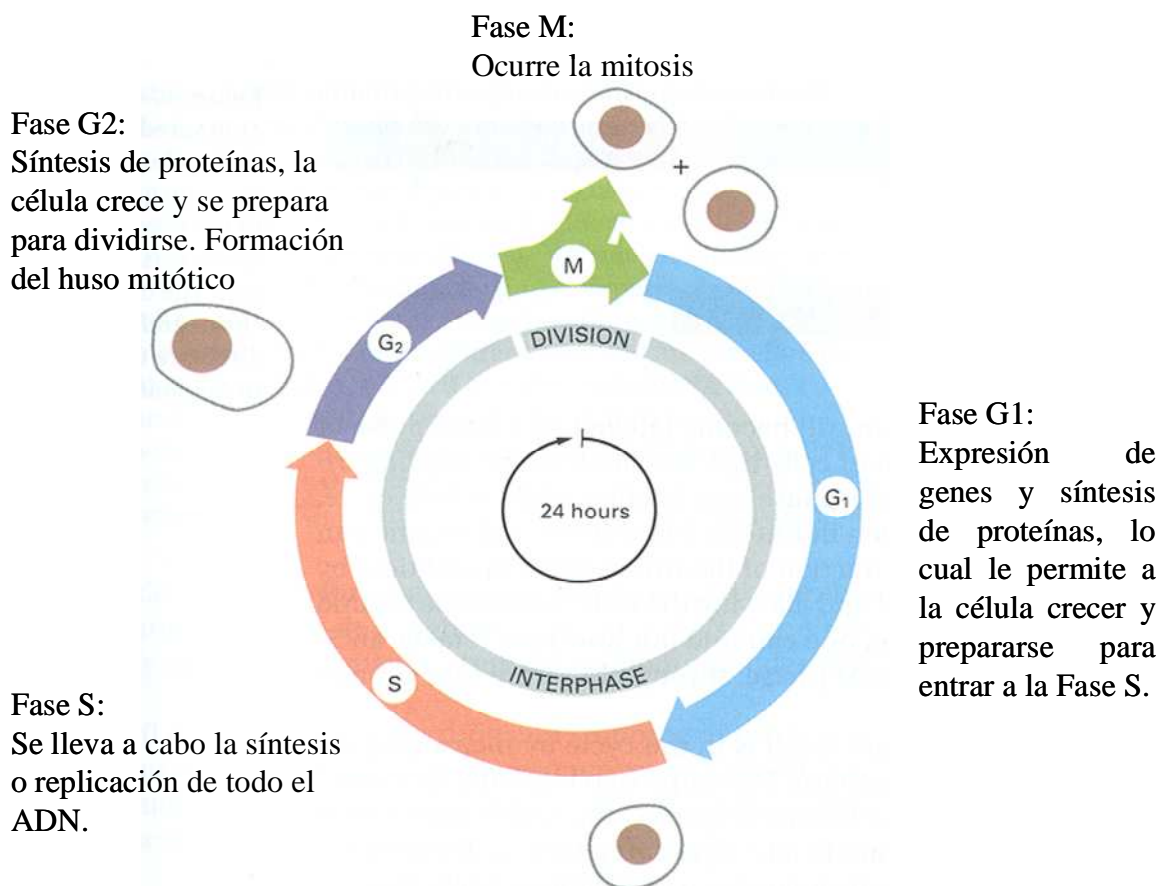


Figura F. Diagrama del ciclo celular en los organismos eucariontes. Se muestran las cuatro fases del ciclo: G1, S, G2 Y M.

3.8.1. La proliferación celular.

El proceso de la proliferación celular es la culminación de una serie de eventos que permiten que una célula se divida, como resultado de la citocinesis, en dos células progenitoras que tendrán la misma información genética que la original. En conjunto, estos eventos estrictamente regulados son lo que conocemos como ciclo celular. La pérdida del control del ciclo celular puede desencadenar ya sea la muerte de la célula o bien, la proliferación desregulada de las células lo cual es propio del estado canceroso. Hoy se acepta que una de las características básicas de las células cancerosas es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división, las células malignas se dividen cuando y donde no deberían hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada la formación de un tumor (*Evan et. al., 2001*).

3.8.2. El control del ciclo celular.

El ciclo de las células eucariontas es dividido en cuatro fases: G1, S, G2 Y M (*Figura F*). La fase S es el período de síntesis del DNA, durante el cual a partir de una cadena se origina una segunda copia de la misma. En la fase M o de mitosis las dos copias de DNA ya como cromosomas condensados se segregan y la célula se divide en dos células hijas genéticamente iguales. El tiempo que transcurre entre una mitosis y otra se denomina período de interfase. Los períodos G1 y G2 son espacios temporales de preparación previos a la duplicación del DNA y a la división celular respectivamente.

Existe además un estado de "reposo" (o latente) de las células que no se encuentran en proliferación denominado Go, en el cual el metabolismo principal de la célula esta disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos como el de transcripción y el de síntesis de proteínas. "In vivo", la mayoría de las células de los mamíferos están en Go (*Ford et. al., 1999*). La falta de factores de crecimiento puede causar la salida de las células del ciclo y su entrada a Go, la estimulación con factores de crecimiento a su vez, puede inducir nuevamente la entrada al estado de proliferación (*Weinstein et. al., 1997*).

La maquinaria que controla el ciclo celular en los eucariontes está compuesta de complejos multi-proteicos formados por una subunidad catalítica cdk (por cinasa dependiente de ciclina) y una subunidad reguladora denominada ciclina que son activados siguiendo un orden específico y desencadenando eventos tales como la replicación del ADN, la formación del huso mitótico y la

segregación de los cromosomas. En humanos se han identificado 9 unidades cdk y 11 ciclinas, que potencialmente conforman 13 complejos cinasas activos (*Johnson et. al., 1999, Morgan 1997*). En células normales la mayoría de estas enzimas están específicamente relacionadas con las distintas fases del ciclo celular; hay complejos enzimáticos para las fases G1, S Y G2/M, donde cada uno de éstos realiza diferentes funciones durante la progresión del ciclo celular (*Johnson 1999*).

En una panorámica general, la activación de las cdk permite que estas enzimas fosforilen y modulen la actividad de una gran variedad de proteínas celulares que incluyen proteínas supresoras de tumores (por ejemplo RB y P53), factores de transcripción (por ejemplo E2F-DPI y la RNA pol III), factores de replicación (por ejemplo DNA pol α y RP A), así como factores de organización de estructuras celulares y de la cromatina (por ejemplo histona H1, lámina A, MAP4). La actividad cinasa de las cdk está regulada a través de la coordinación de diferentes mecanismos, entre los cuales destacan: la transcripción y traducción dependiente del ciclo celular, la proteólisis dependiente del ciclo celular, la localización celular, las modificaciones post-traduccionales y la interacción de los complejos cdk-ciclinas con proteínas inhibidoras de las cdk conocidas como CKI por sus siglas en inglés.

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben de seguir una secuencia definida, donde el término de ciertos eventos debe preceder al comienzo de otros. Por ejemplo, la replicación del ADN debe completarse antes de que la mitosis inicie para asegurar que ambas células reciban una copia completa del genoma.

Dentro del ciclo celular existen una serie de fases de vigilancia o control (conocidos en inglés como "checkpoints") para asegurar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto (*Johnson et. al., 1999; Lowndes et. al., 2000*). Estos puntos de vigilancia están representados por cascadas de señales que involucran sensores, transmisores y efectores que se activan al presentarse en las células situaciones anormales dentro de la progresión del ciclo, como serían errores en los procesos de la replicación, la falta de nutrientes o el daño al material genético entre otros. Por lo cual dentro del ciclo celular encontramos diversos puntos de control como los que están en la transición de G1 a S, durante la fase de síntesis, en la fase G2 o monitorizando la segregación de los cromosomas durante la mitosis (*Zhou et. al., 2001*). La activación de estas fases de control tiene como resultado la inhibición o el retraso de la progresión del ciclo celular para permitir la elección entre distintas señales que llevan a la citocinesis, diferenciación, entrada a la fase de reposo o latencia, o detener el ciclo hasta que las anomalías generadas sean

reparadas correctamente o bien a la eliminación de las células dañadas a través de la activación de mecanismos de muerte celular (*Lowndes et. al., 2000*).

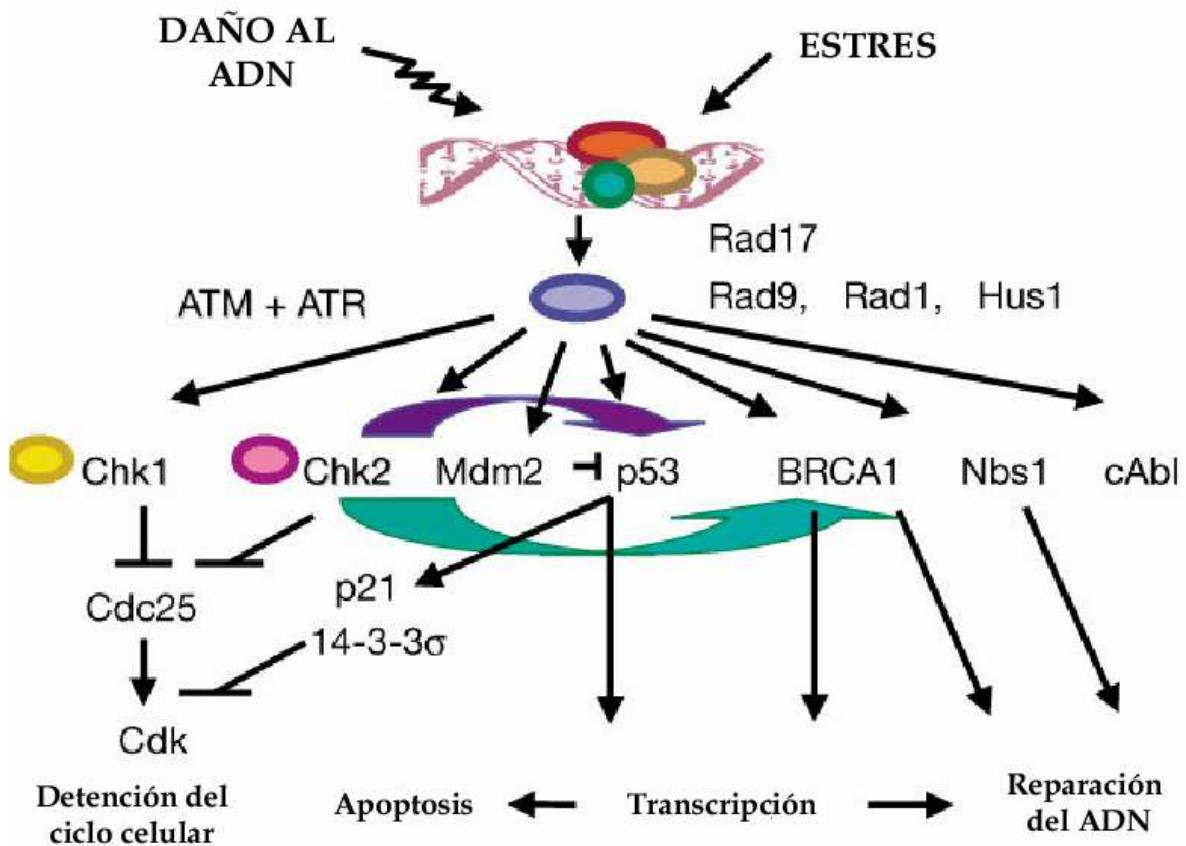


Figura G.- Panorama general de la maquinaria que controla el ciclo celular y sus efectos

La transición de G0 a G1. El control de la proliferación celular en los eucariontes se realiza primero, en la transición de la fase G0 al estado en división activa por los mecanismos de transducción de señales a través de los factores de crecimiento y segundo, en dos etapas de control dentro del ciclo celular de las células en división: uno en la fase G1 tardía que dirige la entrada a la fase S y otro en G2 tardía que regula el inicio de la mitosis.

3.9 APOPTOSIS

La apoptosis se define como la destrucción programada de una célula y es un proceso complejo. La decisión de muerte celular no es un proceso tomado a la ligera. Los organismos multicelulares frecuentemente necesitan deshacerse de células que están en exceso, dañadas o que son

potencialmente peligrosas. Para este fin existe un programa activo a nivel molecular. Este proceso permite al organismo controlar el número de células y el tamaño del tejido además de autoprotgerse de células que amenacen la homeostasis (*Hengartner 2000*).

Descubierta por biólogos del desarrollo y citólogos, la muerte celular programada adquirió un número de nombres en los dos siglos anteriores (*Vaux et.al., 1999*). El término finalmente adoptado es apoptosis acuñado por Currie y colegas en 1972 para describir un tipo común de muerte celular programada que los autores de manera cotidiana observaban en varios tejidos y tipos de células. Los autores notaron que las células en este proceso compartían muchas características morfológicas, las cuales fueron distintas de las características observadas en células que presentaban muerte celular necrótica o patológica y ellos sugirieron que estas características morfológicas compartidas quizás eran el resultado de un programa de muerte celular endógena, evolutivamente conservado y común.

La apoptosis es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis. El organismo utiliza la apoptosis en dos procesos: como parte del desarrollo de estructuras corporales o bien para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo. Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células (*Hengartner 2000*).

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro- o anti-apoptóticos, regulados genéticamente, que actúan de forma activa y equilibrada. Como función necesaria para evitar la sobreproducción celular se sospechaba de su existencia, pero como es un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular ha sido difícil de captar. En 1972, Kerr y col., estudiando organelos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían en los cultivos. Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas que mostraron mediante microscopía electrónica las alteraciones que sufre la célula en un proceso que es de corta duración, durando en tales cultivos menos de una hora.

La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada. Por ejemplo, está frenada durante el desarrollo de espermatogonias, en las criptas de las glándulas intestinales (que es un epitelio de crecimiento rápido) y durante la lactancia en su período preparatorio, en que el tejido mamario aumenta su masa celular. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos. Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir de manera

constante la mitad de una inmensa cantidad de células que sólo en leucocitos significa 5×10^{11} cada 24 hrs. Está estimulada cuando existen células envejecidas, mutadas, neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis o atresia. Se ha estudiado esta condición en neutrófilos envejecidos, en megacariocitos con citoplasma agotado por producción excesiva de plaquetas, en la atresia folicular del ovario, en folículos pilosos en evolución y en la mama durante la involución post-lactancia.

Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas de ambas permiten, en la mayoría de los tejidos, establecer claras diferencias. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos. En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso "silencioso" sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos orgánulos, en especial las mitocondrias que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear la cromatina se condensa agrupada en varios sectores formando cuerpos apoptóticos. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, los fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido. Se ha demostrado, al menos en tejidos epiteliales, que si algo de material apoptótico escapa a la acción de los fagocitos es captado por células vecinas. La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta además por la capacidad de éstas de enviar señales moleculares a la célula que debe morir como mecanismo complementario al que desarrolla la célula misma cuando se determina molecularmente su autodestrucción. El proceso de apoptosis dura entre 30 y 60 minutos en células en cultivo. Uno de los más lentos se produce en células hepáticas que emplea como promedio 3 horas. El estudio e identificación específico de cuerpos apoptóticos se ha logrado con tinciones derivadas de la uridina (TUNEL en que la U corresponde a uridina). Sin embargo, en algunas células como las neuronas, la uridina tiñe también tejidos necróticos perdiendo la especificidad. En tales casos se recurre a anticuerpos monoclonales capaces de reconocer fragmentos de ADN integrados en los cuerpos apoptóticos. La imagen que da la apoptosis al microscopio electrónico se caracteriza por la presencia de fragmentos de cromatina agrupados en conglomerados globuliformes, la granulación fina del contenido citoplasmático, la persistencia de algunos orgánulos hasta el final del proceso, como las mitocondrias, y la integridad de la membrana celular.

3.9.2. Relación de la apoptosis con el ciclo celular

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis (Evan et. al., 2001).

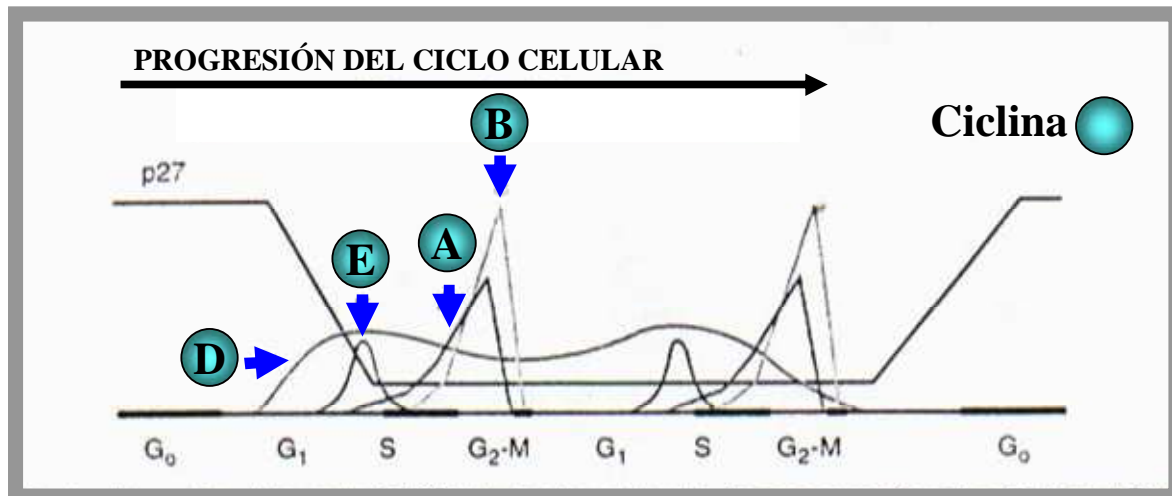


Figura H.- Progresión del ciclo celular y su relación con la cantidad de ciclinas.

Los motores del ciclo celular son complejos proteicos formados por subunidades llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDK), sintetizados por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son altamente inestables, de ahí que el nivel de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados (Figura H). Así en el avance de la fase G1 a la S actúa la ciclina D asociada a las kinasas ciclinadependientes 2, 4 y 6 (cdk 2 4 6). En la segunda mitad del G1 aumenta la presencia de ciclina E con la kinasa ciclinadependiente 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con cdk 2 y en la fase G2, la ciclina B con cdk 2. En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G₀ (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares (en especial de su ADN), que en caso de no poder ser corregidos inducen el mecanismo de muerte celular. En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. Durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.

3.9.3. Control de la apoptosis.

En los mecanismos moleculares que controlan la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiado es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos (Riedl et al., 2004). Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. Se han descrito hasta 40 sustratos en la catálisis, proceso que en células cultivadas dura entre 30 y 40 minutos. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares (Figura I).

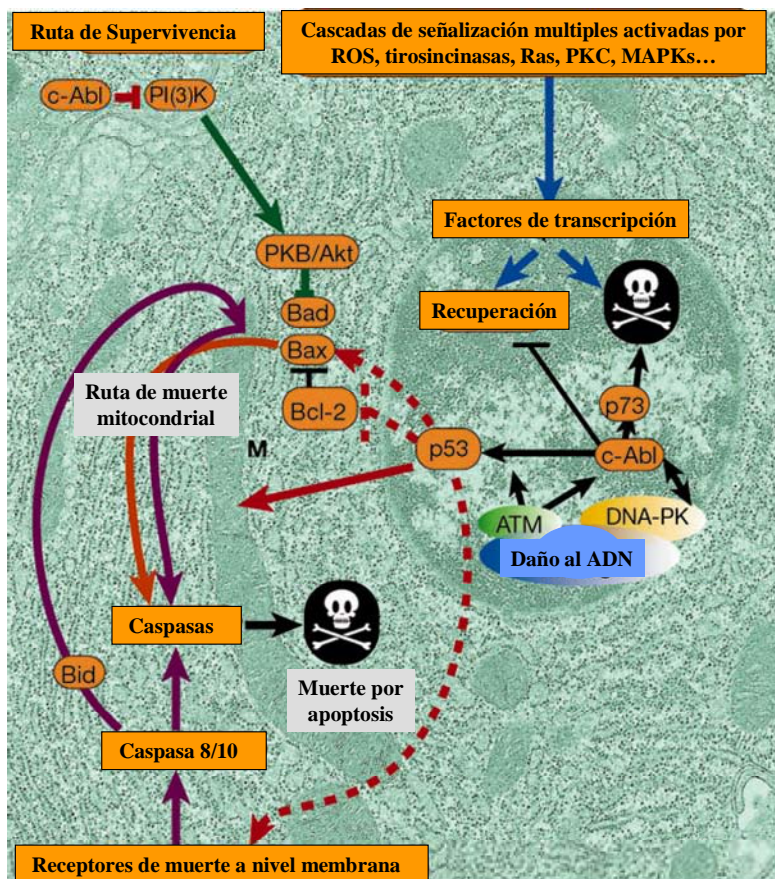


Figura I.- Esquema general de activación y control de la apoptosis

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte a nivel membrana" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (fas associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas 8 y 10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteín-quinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana, TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteín-quinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario (*Hengartner 2000*).

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana, entre ellas, el citocromo c. El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa 9. Una vez que la caspasa 9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa 3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo "BH3-only" activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis.

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa 8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa 9.

La apoptosis puede ocurrir, por ejemplo, cuando una célula se halla dañada y no tiene posibilidades de ser reparada, o cuando ha sido infectada por un virus. La "decisión" de iniciar la apoptosis puede provenir de la célula misma, del tejido circundante o de una reacción proveniente del sistema inmune. Cuando la capacidad de una célula para realizar la apoptosis se encuentra dañada (por ejemplo, debido a una mutación), o si el inicio de la apoptosis ha sido bloqueado (por un virus), la célula dañada puede continuar dividiéndose sin mayor restricción, resultando en un tumor que puede ser de carácter canceroso. Por ejemplo, como parte del "secuestro" del sistema genético de la célula llevado a cabo por los papillomavirus humanos (HPV), un gen denominado E6 se expresa originando un producto que degrada la proteína p53, vital para la ruta apoptótica.

También condiciones de stress como la falta de alimentos, así como el daño del ADN provocado por tóxicos o radiación, pueden inducir a la célula a comenzar un proceso apoptótico. Un ejemplo sería la apoptosis mediada por la enzima nuclear, poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1), crucial en el mantenimiento de la integridad genómica. La activación masiva de dicha enzima puede depletar la célula de nucleótidos ricos en energía, provocando una cadena de transducción de señales del núcleo a la mitocondria que iniciaría la apoptosis.

La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas (viridiplantae) como de animales pluricelulares (metazoa), y no provoca la respuesta inflamatoria característica de la necrosis. La apoptosis no se parece al tipo de reacción resultante del daño a los tejidos debido a infecciones patogénicas o accidentes. En lugar de hincharse, reventar y derramar su contenido, posiblemente dañino hacia el espacio intercelular, las células en proceso de apoptosis y sus núcleos se encogen, y con frecuencia se fragmentan. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente (*Jacobson et.al., 1997*).

En un organismo adulto, la cantidad de células que componen un órgano o tejido debe permanecer constante, dentro de ciertos límites. Las células de la sangre y de piel, por ejemplo, son constantemente renovadas por sus respectivas células progenitoras. Por lo tanto, esta proliferación de nuevas células tiene que ser compensada por la muerte de otras células. A este proceso se le conoce como homeostasis, aunque algunos autores e investigadores han sugerido homeocinesis como un término más preciso y elocuente.

La homeostasis se logra cuando la relación entre la mitosis y la muerte celular se encuentra en equilibrio. Si este equilibrio se rompe, pueden ocurrir dos cosas: 1). Las células se dividen más rápido de lo que mueren, desarrollando un tumor. 2) Las células se dividen más lentamente de lo que mueren, produciéndose un grave trastorno de pérdida celular. Ambos estados pueden ser fatales o potencialmente dañinos

Ciertas células del sistema inmunitario, los linfocitos B y linfocitos T, son sofisticados agentes de la respuesta defensiva del organismo frente a infecciones, así como células propias que hayan adquirido o desarrollado algún tipo de malignidad. Para llevar a cabo su trabajo, las células B y T deben tener la habilidad de discriminar lo propio de lo extraño y lo sano de lo enfermo, gracias a la especialidad de sus receptores. De hecho, los linfocitos T citotóxicos pueden ser activados por fragmentos de proteínas expresadas inapropiadamente (derivadas, por ejemplo, de una mutación maligna) o por antígenos extraños producidos como consecuencia de una infección intracelular. Después de activarse tienen la capacidad de migrar, proliferar y reconocer las células afectadas, induciendo una respuesta de muerte celular programada.

Los receptores de las células B y T inmaduras no se generan por procesos de una elevada precisión, sino por procesos aleatorios de elevada capacidad para generar variabilidad. Esto significa que muchas de estas células inmaduras pueden no ser efectivas (porque su receptor no sea capaz de unir ningún antígeno conocido) o ser peligrosas para el propio organismo porque sus receptores sean capaces de reconocer con elevada afinidad antígenos propios. Si estas células fuesen liberadas sin otros procesamientos, muchas podrían volverse autorreactivas y atacar células sanas. El mecanismo por el que el sistema inmune regula este proceso es la eliminación tanto de las no efectivas como las potencialmente autorreactivas mediante apoptosis.

Todos los tejidos dependen de una continua recepción de señales de supervivencia. En el caso de las células T, mientras se desarrollan y maduran en el timo, las señales de supervivencia dependen de su capacidad para reconocer antígenos extraños. Aquellas que no superan esta prueba, alrededor de un 97 % de las células T producidas, son eliminadas por apoptosis. Las supervivientes son enfrentadas a su vez frente a antígenos propios, y aquellas que reconocen estos antígenos con elevada afinidad son eliminadas de la misma manera.

El desarrollo de un sistema inmune maduro y efectivo depende de una serie de reguladores positivos y negativos de las vías de apoptosis. La apoptosis es una función biológica de gran relevancia en la patogenia de varias enfermedades estudiadas hasta el momento. Podemos

destacar el cáncer, malformaciones, trastornos metabólicos, neuropatías, lesiones miocárdicas y trastornos del sistema inmunitario.

4. HIPÓTESIS

FASE 1

Dado que el metabolismo de anfetaminas en consumidores está relacionado con el citocromo 2D6, encontraremos que la distribución fenotípica del metabolismo en consumidores de esta droga es similar a las curvas de distribución de otros sustratos de CYP2D6.

FASE 2

Las anfetaminas son citotóxicas y genotóxicas y estos efectos están relacionados con la presencia de polimorfismos en el citocromo 2D6.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar en consumidores de anfetamina la formación del metabolito hidroxilado y su posible relación con el fenotipo de CYP2D6, así como evaluar si las anfetaminas producen citotoxicidad, modifican la proliferación celular, dañan el ADN e inducen apoptosis en linfocitos humanos, y si estos efectos están relacionados con los polimorfismos del citocromo 2D6.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

FASE 1

1. Determinar la relación metabólica (MR) de anfetamina y su metabolito hidroxilado en orina de individuos que consumieron anfetaminas mediante su detección e identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
2. Construir con los datos de MR la distribución de relación metabólica para anfetamina en operadores que resultaron positivos al consumo de anfetaminas, lo que nos permitirá identificar el fenotipo.

FASE 2

3. Evaluación de efectos citotóxicos en cultivos de linfocitos de dl-anfetamina y dl-metanfetamina mediante la determinación de viabilidad por la técnica de diacetato de fluoresceína con bromuro de etidio (FDA) en un intervalo de dosis.
4. Determinación de efectos en la proliferación celular a la exposición de DL-Anfetamina y DL-Metanfetamina en cultivos de linfocitos mediante la determinación del índice nuclear.
5. Detección de genotoxicidad provocada por la exposición de cultivos de linfocitos a anfetaminas, utilizando la técnica de micronúcleos como indicador.
6. Determinación de anfetaminas en sobrenadante de cultivos de linfocitos e identificación de posibles metabolitos de anfetaminas producidos por el metabolismo propio de los linfocitos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
7. Detección de la presencia del ARN mensajero de CYP2D6 en linfocitos.
8. Implementación de técnicas para la determinación de polimorfismos del CYP2D6 con importancia en la actividad enzimática de este citocromo.

9. Relación de los polimorfismos de CYP2D6 encontrados con los resultados de genotoxicidad, citotoxicidad y metabolismo de anfetaminas.
10. Evaluación del daño al ADN en individuos susceptibles por el tratamiento de cultivos de linfocitos con anfetaminas, utilizando la técnica de electroforesis unicelular ó cometa.
11. Detección de la inducción de apoptosis en cultivo de linfocitos tratados con ambas anfetaminas.
12. Evaluación del efecto de la dimetiltiourea en la inducción de apoptosis en cultivo de linfocitos tratados con ambas anfetaminas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Fase I

6.1.1. Detección de anfetaminas en orina de individuos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

6.1.1.1. Población de estudio y obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas en un operativo realizado en carreteras federales a conductores del transporte público. Se analizaron aproximadamente 1000 individuos (edades oscilaron de 18 a 65 años) quienes dieron su consentimiento informado a través del acta de iniciación de examen toxicológico con su respectiva cadena de custodia de las muestras. Conjuntamente se realizó un examen médico en operación que incluyó una entrevista para detectar consumo de medicamentos. Las muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos de operación y acorde a la regulación de la Secretaria de Comunicaciones y Transportes. Las muestras fueron analizadas inicialmente por una técnica de preselección de positivas basada en un inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT); dicho reactivo fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante Dade Behring y se analizaron cinco familias de drogas (cocaína, tetrahidrocannabinol, anfetaminas, opiáceos y fenciclidina) y alcohol. Todos los presuntos positivos de esta metodología fueron confirmados por GC/MS. De todos los positivos confirmados se seleccionaron 129 muestras que resultaron positivas al consumo de anfetaminas, descartándose aquellas que habían reportado tratamiento farmacológico en la entrevista inicial de su examen médico. Orinas negativas fueron obtenidas del personal del laboratorio y analizadas por GC/MS para descartar consumo de alguna droga y la posible presencia de algún interferente.

6.1.1.2. Proceso de extracción y derivación de las anfetaminas

Soluciones patrón para anfetamina, metanfetamina, hidroxianfetamina y sus respectivos estándares deuteriados fueron preparadas, selladas y refrigeradas a 4°C hasta el momento de su utilización. Orina negativa a drogas de abuso fue empleada como control para preparar estándares mediante la adición de anfetaminas a diferente concentración, tanto las muestras como los estándares fueron extraídos de la siguiente forma: 2 mL de orina fueron pipeteados en tubos de 10 mL, se le adicionaron 25 µl estándar interno deuteriado (Concentración final = 500 ng/mL), 0.5 mL de NaOH 1N fueron agregados, posteriormente se le adicionó 3 mL de diclorometano. Los tubos fueron tapados, agitados y centrifugados a baja velocidad por cinco

minutos, la capa superior acuosa fue aspirada y desechada, la capa inferior orgánica fue transferida a un vial cónico nuevo, al cual se le adicionó 0.1mL de una solución de metanol:HCl (9:1). Esta mezcla fue evaporada a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Después de la evaporación el extracto seco fue reconstituido con 40 µl de un agente derivante BSTFA:TMCS (95:5), se agito e incubó durante 30 minutos a 60 °C. Un microlitro del derivado fue inyectado en el CG/EM.

6.1.1.3. Condiciones del CG/EM.

El análisis fue realizado en un cromatógrafo de gases modelo 6890 acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico de tipo cuadrupolar modelo 5970, ambos de Agilent Technologies. El cromatógrafo de gases tiene montada una columna capilar de sílice fundido de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y con una película de 0.32 micrometros. El gas acarreador fue helio a un flujo de 1 mL/min. El modo de operación fue inyección “splitless”, el puerto de inyección y la zona de transferencia fueron mantenidas a 250 °C. Normalmente se inyectaba 1 µL de muestra. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C durante 1 minuto, posteriormente se aplicaba un gradiente de temperatura de 10 °C/min. hasta alcanzar 150 °C y mantenido en esta temperatura durante 8 minutos. El tiempo total de análisis se estableció en 10 minutos. El detector selectivo de masas fue operado en modo “scan” (intervalo de masas de 50 a 400) con el propósito de establecer el patrón de fragmentación que se emplearía para la identificación estructural, una vez establecido se seleccionaron los iones y la metodología final fue operada en monitoreo simple de iones (SIM)

6.2. Fase II *in vitro*

6.2.1. Muestras, extracción y cultivo de linfocitos

Para los estudios *in vitro* de la fase II se emplearon linfocitos aislados de donadores sanos cuyas edades oscilaban de 20 a 40 años, se obtuvo su consentimiento informado y se les extrajo sangre periférica con heparina. Los linfocitos se aislaron usando un gradiente de densidad de sacarosa (Histopaque 1077, Sigma), 2.5 millones de células se cultivaron en 5 mL de medio suplementado RPMI-1640 (Sigma) el cual fue enriquecido con suero fetal bovino 15% v/v (Hyclone), aminoácidos no esenciales 1% v/v (Gibco), L-glutamina 1% v/v (Gibco) y 0.2 mL de fitohemaglutinina (PHA, Gibco).

6.2.2. Evaluación de la citotoxicidad de anfetaminas

La citotoxicidad fue evaluada por medio de una técnica de doble fluoróforo que emplea diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/Etbr), el primero es un indicador del metabolismo celular y el segundo un marcador de la pérdida irreversible de la integridad de la membrana nuclear. Los linfocitos de los donadores fueron aislados y cultivados en medio suplementado RPMI-1640 (Concentración de linfocitos 0.5 millones de células/mL), se incubaron a 37 °C durante 24 horas, al cumplirse el tiempo se expusieron los linfocitos a diferentes concentraciones de anfetamina y metanfetamina y se incubaron 24 horas adicionales. Al cumplirse el tiempo se tomó una alícuota de 0.1 mL, se centrifugó y resuspendió en 25 µL de medio RPMI-1640 adicionándole 25 µL de una solución fresca de FDA/Etbr, se mezcló y colocó una porción en un portaobjetos. Por lo menos 200 células fueron contadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 para evaluar citotoxicidad.

6.2.3. Citostaticidad y Genotoxicidad de las anfetaminas

Ambas determinaciones fueron realizadas por medio de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (Fenech 2000). Linfocitos aislados fueron cultivados a 37°C en medio suplementado RPMI-1640 durante 24 horas. Posteriormente fueron expuestos a diferentes concentraciones de anfetamina y metanfetamina (500-2500 ng/mL), se incubaron por 24 horas, al término del tiempo se le adicionó citokalacina (Sigma) a una concentración de 6 µg/mL se incubaron 24 horas adicionales. Las células fueron cosechadas, fijadas con una solución fría de metanol:ácido acético (3:1) y cuidadosamente se colocó una porción en un portaobjetos frío teniendo cuidado de evitar la destrucción de la membrana celular. Se dejó secar las laminillas y fueron teñidas con colorante Wright's (Merck, Germany). Posteriormente fueron evaluadas por microscopía.

La citostaticidad fue evaluada mediante el indicador de cinética de proliferación que se obtiene al observar en el microscopio las laminillas teñidas y contar 200 células, contabilizando el número de células mononucleadas (M), binucleadas (B) y polinucleadas (P); con estos valores se obtiene el Índice de División Nuclear (NDI) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{NDI} = (1(\#M) + 2(\#B) + 3(\#P))/200$$

La genotoxicidad se evaluó en las mismas laminillas contando el número de células que presentaban micronúcleos utilizando para su identificación los criterios de Fenech 2003. Para obtener la frecuencia de micronúcleos fue necesario evaluar 2000 células binucleadas.

6.2.4. Ensayo cometa o Electroforesis en gel de células individuales (SCGE)

Se prepararon cultivos de linfocitos de cada donador para cada experimento efectuado. A diferencia de los cultivos en las otras técnicas, en esta técnica no se requiere estimulación con fitohemaglutinina, por lo cual no se le adiciona esta sustancia. Estos linfocitos sin estimular fueron empleados para evaluar el tiempo y las curvas dosis respuesta de inducción de daño del ADN al ser tratados con diferentes dosis de anfetamina y metanfetamina. Alícuotas (suspensión con aproximadamente 20,000 células) fueron analizadas como se describe en Singh et., al. (1988), estas alícuotas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 1 minuto. Simultáneamente se prepararon laminillas embebiendo células (linfocitos) en agarosa para darles un soporte, posteriormente se sumergieron en una solución de lisis con alto contenido de detergentes (1 % de Triton X-100, 10 % de DMSO) y sales (EDTA 100 mM, NaCl 2.5 M, Tris 10 mM) dejando expuesto el DNA, después las laminillas se pasaron a un buffer de fosfatos bajo condiciones alcalinas (pH 10) por espacio de 20 minutos (tiempo de desenrollamiento de las hebras del DNA). En seguida se realizó una electroforesis por 20 minutos bajo las mismas condiciones alcalinas, posteriormente se neutralizaron las células con un buffer de neutralización (pH 7.5), dejando las células durante 5 minutos y fijándose en etanol al 70%. Las laminillas se dejaron secar y finalmente fueron teñidas con 25 µl de un fluorocromo (BrEt), el cual se une al DNA. Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia (filtro de excitación de 515-560 nm) con el objetivo de aumento 20X y con la ayuda de un ocular graduado, evaluando la migración de los fragmentos de DNA de 50 núcleos por cultivo tratado; una mayor longitud de la cola se relaciona con un mayor daño al DNA (*figura D*) (Rojas et. al., 1999).

6.2.5. Determinación del genotipo de CYP2D6 de los individuos evaluados.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron muestras de ADN genómico (gDNA) provenientes de los sujetos evaluados en la fase in Vitro. El ADN fue aislado de sangre periférica mediante el empleo de un reactivo denominado comercialmente como “DNA extraction nucleon kit”

(Amersham Pharmacia Biotech). La pureza de las muestras de ADN fue verificada y cuantificada por espectrofotometría y posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

La determinación de los alelos de CYP2D6 *2, *3, *4, *5, *6, *10, *9, *17 fue realizada por el método de PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de fragmentos largos de restricción), para lo cual se realizó lo siguiente:

6.2.5.1. Amplificación del gen CYP2D6

El DNA genómico (gDNA) se utilizó como molde para la amplificación del gen CYP2D6 completo (5 kb), tomando como iniciadores 5'CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTC A3' (forward) y 5'ACTGAGCCCTGGG AGGTAGGTA3' (reverse) (Lundqvist et. al., 1999). Las reacciones fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones: 2mM de MgSO₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada iniciador, 1 U de DNA polimerasa Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) y 1X del buffer correspondiente en una reacción total de 25 µl con 3 µl de gDNA (≈ 1 µg/µl). Los ciclos de amplificación fueron 94° por 1 min y 35 ciclos de 94° por 30 seg, 58° por 30 seg y 68° por 6 min, terminando la reacción con 7 min adicionales a 68°. Los productos resultantes fueron cuantificados y llevados a una concentración de 1 µg/µl.

Algunas reacciones de amplificación mostraban un producto nulo, y se procedió a amplificar el gen en dos fragmentos para dichas muestras. El fragmento correspondiente a la parte 5' de CYP2D6 se amplificó con los iniciador 5'CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA3' y 5'GGCTGGGTCCCAGGTCATCC3' para un producto final de 2910 pb y el fragmento correspondiente a la parte 3' de CYP2D6 se amplificó con los iniciadores 5'GCTGGGGCCTGAGACTT3' y 5'ACTGA GCCCTGGGAGGTAGGTA3' para un producto final de 2384 pb. Ambos fragmentos fueron amplificados bajo las mismas condiciones que el producto del gen completo.

6.2.5.2. PCR anidado (“Nested PCR”)

El gen CYP2D6 completo o sus dos fragmentos se utilizaron como molde en subsecuentes reacciones de PCR para obtener subproductos de diversos tamaños. Estos subproductos representan fragmentos del gen que fueron analizados para los diversos polimorfismos estudiados por medio de una técnica que emplea enzimas de restricción para obtener cadenas de ADN de

longitud variable y denominada por sus siglas en ingles como RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism". Todas las reacciones fueron de 25 µl totales, bajo las siguientes condiciones: 2mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada iniciador, 1 U de DNA polimerasa Taq (Invitrogen), 1X del buffer indicado, 5% de DMSO y 3 µl del producto inicial de 5 kb diluido. Las secuencias de los iniciadores se obtuvieron de McElroy et al., (2000). Todas las digestiones se realizaron con enzimas de New England Biolabs.

6.2.5.3. Variedades alélicas CYP2D6*2, *34, *9 mediante la amplificación de un fragmento de 386 pb.

Se utilizaron los iniciadores 5'AGGCCTTCCTGGCAGAGATGAAG3' y 5'CCCCTGCACTGTTTCCCAGA3'. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial (5 min a 95°); 35 ciclos de 30 seg a 94°, alineamiento a 57° por 30 seg y 45 seg a 72°, y elongación terminal (7 min a 72°). Tras la amplificación, este producto fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y digerido con las enzimas de restricción BspMI y MbolI en las condiciones apropiadas. Los fragmentos de esta digestión se analizaron en agarosa al 2%, y los diferentes patrones encontrados nos indicaban la presencia ó ausencia de los polimorfismos AGA2613-5del (CYP2D6*9) y C2850T (CYP2D6*2 y *34). Estos patrones se desglosan en la *Tabla C*.

6.2.5.4. Variedades alélicas CYP2D6*2, *4, *10 mediante la amplificación de un fragmento de 881 pb.

Se utilizaron los iniciadores 5'CGTCTAGTGGGGAGACAAAC3' y 5'CTCAGCCTCAACGTACCCCT3'. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial (5 min a 95°); 35 ciclos de 30 seg a 94°, alineamiento a 57° por 30 seg y 1 min a 72°, y elongación terminal (7 min a 72°). El manejo de estos productos fue similar al fragmento anterior, utilizando la enzima de restricción BanII. Los patrones de digestión de este fragmento nos indican la presencia ó ausencia del polimorfismo G4180C (CYP2D6*2, *4, *10) (*Tabla C*).

6.2.5.5. Variedades alélicas CYP2D6*4, *10 mediante la amplificación de un fragmento de 433 pb.

Se utilizaron los iniciadores 5'TCAACACAG CAGCAGGTTCA3' y 5'CTGTGGTTTCACC CACC3'. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial (5 min a 95°); 35 ciclos de 30 seg a 94°, alineamiento a 50° por 10 seg y 45 seg a 72°, y elongación terminal (7 min a 72°). La

digestión de estos productos se realizó con la enzima HphI. Los patrones de digestión de este fragmento nos indicaban la presencia ó ausencia del polimorfismo C100T (CYP2D6*4, *10) (*Tabla C*).

6.2.5.6. Variedades alélicas CYP2D6*4, *6 mediante la amplificación de un fragmento de 353 pb.

Se utilizaron los iniciadores 5'CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGACCAG3' y 5'GAGACTCCTCGGTCTCTCG3'. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial (5 min a 95°); 35 ciclos de 30 seg a 94°, alineamiento a 57° por 30 seg y 45 seg a 72°, y elongación terminal (7 min a 72°). La digestión de estos productos se realizó con la enzima BstNI. Los patrones de digestión de este fragmento nos indicaban la presencia ó ausencia de los polimorfismos T1707del (CYP2D6*6) y G1846A (CYP2D6*4) (*Tabla C*).

6.2.5.7. Variedades alélicas CYP2D6*3 mediante la amplificación de un fragmento de 201 pb.

Se utilizaron los iniciadores 5'GCTGGGGCCTGAGACTT3' y 5'GGCTGGGTCCCAGGT CATCC3'. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial (5 min a 95°); 35 ciclos de 30 seg a 94°, alineamiento a 57° por 30 seg y 45 seg a 72°, y elongación terminal (7 min a 72°). La digestión de estos productos se realizó con la enzima BsaAI. La digestión de este fragmento nos indicaba la presencia del polimorfismo A2549del (CYP2D6*3) (*Tabla C*).

6.2.5.8. Detección de la delección del gen CYP2D6 (CYP2D6*5)

Se realizaron reacciones de PCR con los iniciadores 5'ACCGGGCACCTGTACTCCTCA 3' y 5'GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC 3' bajo las condiciones de la polimerasa Platinum Taq High Fidelity, con ciclos de amplificación de 1 min a 94° inicial, 35 ciclos de 30 seg a 94°, 30 seg a 62° y 6 min a 68°, y 7 min a 68° finales. Esta amplificación mostraría un producto de 3.5 kb de estar presente la delección, ya que amplifica una parte río arriba de CYP2D6 así como el 5' de CYP2D7. Si el gen se encontrara presente, esta amplificación no mostraría un producto, debido a que las condiciones no permiten una amplificación de 8.5 kb (3.5 kb + 5 kb de CYP2D6).

TABLA C

Polimorfismo	Frag	Patrones de digestión (pb)		
		wt/wt	wt/mt	mt/mt
C100T	433	362 71	362 262 100 71	262 100 71
T1707del	353	190 163	190 163 139 23	190 139 23
G1846A	353	190 163	353 190 163	353
A2549del	201	201	201 180 20	180 20
AGA2613-5del	386	230 124 32	262 230 124 32	262 124
C2850T	386	230 124 32	354 230 124 32	354 32
G4180C	881	420 235 107 101 18	420 336 235 107 101 18	420 336 107 18

6.2.6. Detección de apoptosis mediante anexina

Las células responden a señales de inducción específica para iniciar el proceso intracelular que resulta en cambios fisiológicos característicos. Entre estos se encuentra la externalización de fosfatidilserina (PS) hacia la membrana celular, ruptura y degradación de proteínas celulares específicas, compactación y fragmentación de cromatina nuclear y pérdida de la integridad de la membrana (en fase tardía).

Anexina V es un fosfolípido dependiente de calcio que se liga a proteínas con alta afinidad por fosfatidilserina (PS) (*Van Heerde et. al. 1995*), un componente de membrana normalmente localizado en la cara interna de la membrana celular (*Fadok et.al., 1992*). En fases temprana del proceso apoptótico, moléculas de fosfatidil serina son externalizadas hacia la superficie externa de la membrana donde anexina V puede fácilmente unirse a ellas (*Koopman et.al., 1994, Vermes et al., 1995*). El ensayo de Guava Nexin™ utiliza anexina V-PE para detectar PS en la membrana externa de las células apoptóticas. El fluoróforo no permeable en las células 7-Amino-actinomicina-D (7-AAD), esta incluido en el ensayo como un indicador de integridad estructural de la membrana (*Schmidt et.al., 1992*). 7-AAD es excluido de células vivas y de células en apoptosis temprana, pero permea en etapas de apoptosis tardía y en células muertas. Tres poblaciones de células pueden distinguirse con este ensayo:

1. Células no apoptóticas: Anexina V (-) y 7-AAD (-)
2. Células en apoptosis temprana: Anexina V (+) y 7-AAD (-)
3. Células en apoptosis tardía y células muertas: Anexina V (+) y 7-AAD (+).

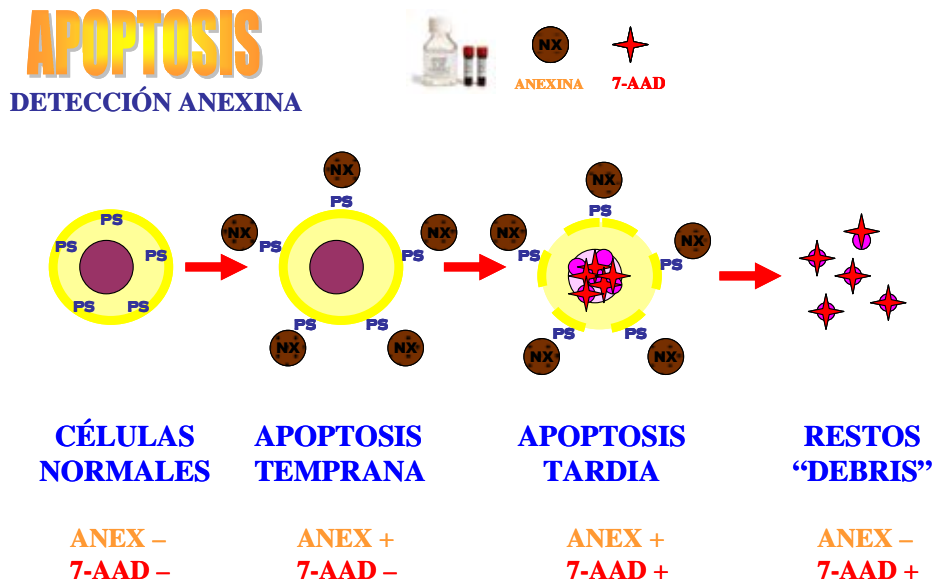


FIGURA J.- Esquema que muestra las fases que se pueden detectar de la apoptosis por anexina y 7-AAD.

Tomar una alícuota de 40 μ L del cultivo de linfocitos, adicionarle 500 μ L de solución PBS, agitar y centrifugar a 8000 rpm durante 4 minutos, decantar y resuspender en 100 μ L de buffer de anexina 1X, agitar y adicionar 5 μ L de Ab anexina 1X y 5 μ L de 7-AAD (kit de Guava Nexin), incubar 20 minutos en obscuridad y a una temperatura inferior de 6 $^{\circ}$ C, centrifugar 8000 rpm durante 4 minutos, lavar con 300 μ L de buffer anexina 1X, centrifugar a 8000 rpm durante 4 minutos, decantar sobrenadante y resuspender en 300 μ L de buffer de anexina 1X. Analizar con equipo GUAVA según procedimientos del fabricante Guava Technologies inc, USA. Los resultados son exhibidos mediante gráficas que incluyen cuadrantes donde se distribuye el porcentaje de células en cada cuadrante además de la intensidad de fluorescencia media de la anexina V y 7-AAD y los parámetros para cada una de las poblaciones de células dependientes de la fase de apoptosis en la que se encuentra.

7. RESULTADOS

7.1 FASE I

7.1.1. Obtención del fenotipo determinando la relación metabólica mediante la detección de anfetaminas en orina de individuos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

En 109 individuos identificados como consumidores de anfetaminas en el sector carretero se detectó que la anfetamina es la principal droga de consumo (**Tabla 1**); su fenotipo fue obtenido determinando la Relación Metabólica (RM) que permitió la clasificación de estos individuos en tres grupos como lo muestra la **Fig. 1**,

Tabla 1.- Concentración de anfetaminas presentes en la orina de los individuos que resultaron positivos en un operativo realizado a 1000 individuos en carreteras federales de México.

Anfetamina en orina (NG/ML)	# INDIVIDUOS	Metanfetamina en orina (NG/ML)	# INDIVIDUOS
1000 a 5000	19	1000 a 5000	1
5000 a 10000	44	5000 a 10000	4
10000 a 20000	33	10000 a 20000	4
2000 a 50000	12	2000 a 50000	2
> 50000	1	> 50000	1
Total	109	Total	12

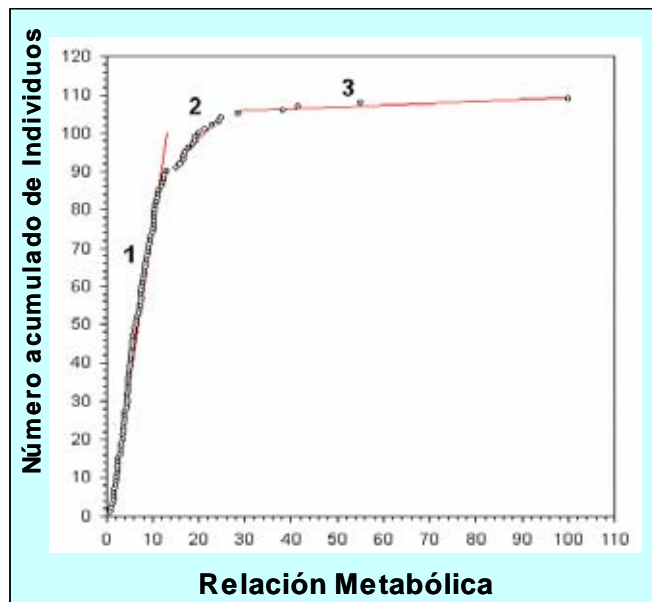


Fig 1. Relación metabólica de 109 individuos que mediante análisis estadístico de las pendientes permite clasificar a los individuos en tres grupos de metabolizadores. La relación metabólica (RM) se obtiene con la siguiente fórmula: $RM = \frac{[Anfetamina]}{[metabolito\ de\ anfetamina]}$

Posteriormente mediante una grafica de frecuencias y basados en la cantidad del metabolito y en la clasificación para otros sustratos del CYP2D6 se estratificaron los tres grupos en metabolizadores rápidos (MR), metabolizadores intermedios (MI) y metabolizadores lentos (ML) como se observa en la **Fig. 2**, además de encontrarse que el metabolismo de la anfetamina presenta una curva de distribución similar a la de otros sustratos de CYP2D6. Es la primera vez que se obtienen para este sustrato en humanos las diferencias individuales en el fenotipo.

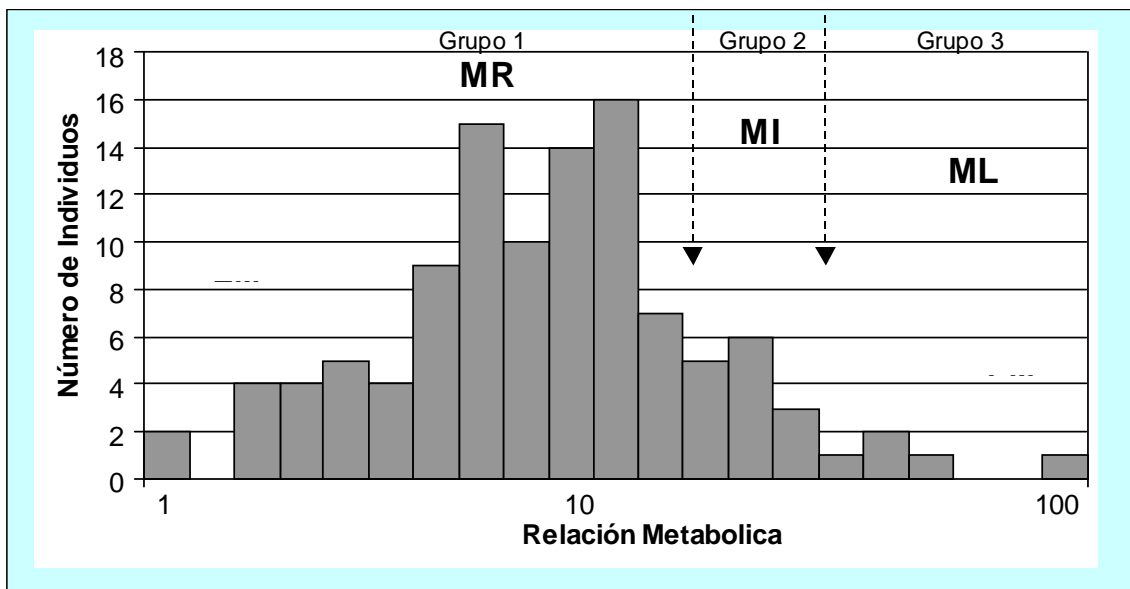


Fig 2. Determinación de la relación metabólica de anfetamina y su metabolito hidroxilado en 109 individuos (Fenotipo de metabolizadores)

7.2. FASE II

7.2.1 Efecto sobre la viabilidad celular (citotoxicidad)

En la segunda fase se planteó la evaluación en cultivo de linfocitos humanos de los efectos citotóxicos, genotóxicos y metabólicos del tratamiento in vitro con dos anfetaminas. En la **figura 3** se presentan los resultados obtenidos en los linfocitos de tres individuos tratados con cinco dosis de dl-anfetamina y dl-metanfetamina, empleando como control positivo arsénico a una concentración final de 10^{-5} M.

N=3 individuos por triplicado

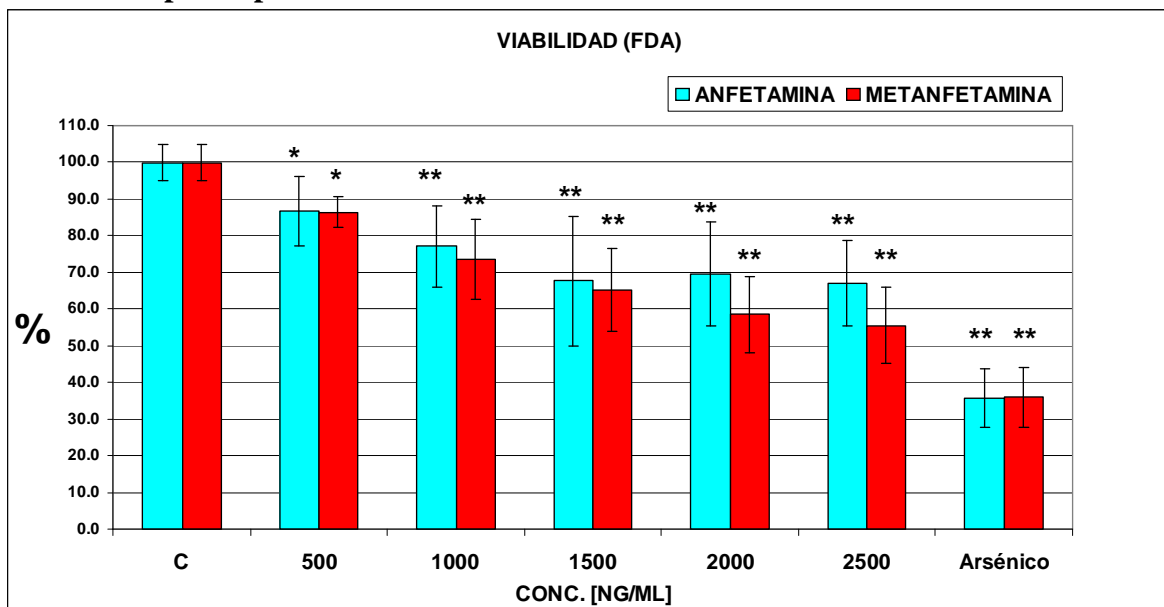


Fig 3. Efecto de las anfetaminas en la viabilidad de linfocitos tratados en un intervalo de dosis de 500 a 2500 ng/ml, empleando arsénico como control positivo. El nivel de significancia se calculó con t de student. * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

Dado que encontramos diferencias individuales en los efectos sobre la viabilidad, la **fig. 4** nos muestra como se comportan los tres individuos para dos de las concentraciones de anfetamina, en la grafica se observa una diferencia significativa en los efectos observados en los individuos A y B con respecto al C.

N=3 individuos por triplicado

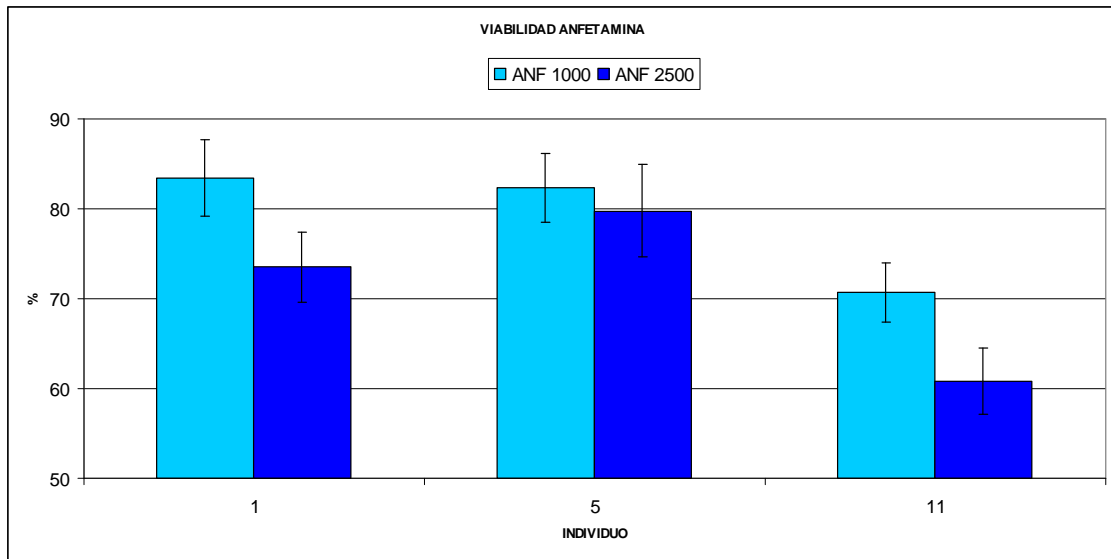


Fig 4. Efecto de la anfetamina en la viabilidad de linfocitos tratados con dosis de 1000 y 2500 ng/ml en 3 individuos

Al evaluar metanfetamina, la **fig. 5** nos muestra como se comportan los tres individuos para dos de las concentraciones de metanfetamina, en la gráfica se observa una diferencia significativa entre el efecto en el individuo A con respecto al B y al C en la concentración de 1000 ng/ml. En el caso de la concentración de 2500 ng/ml el efecto fue el mismo en los tres.

N=3 individuos por triplicado

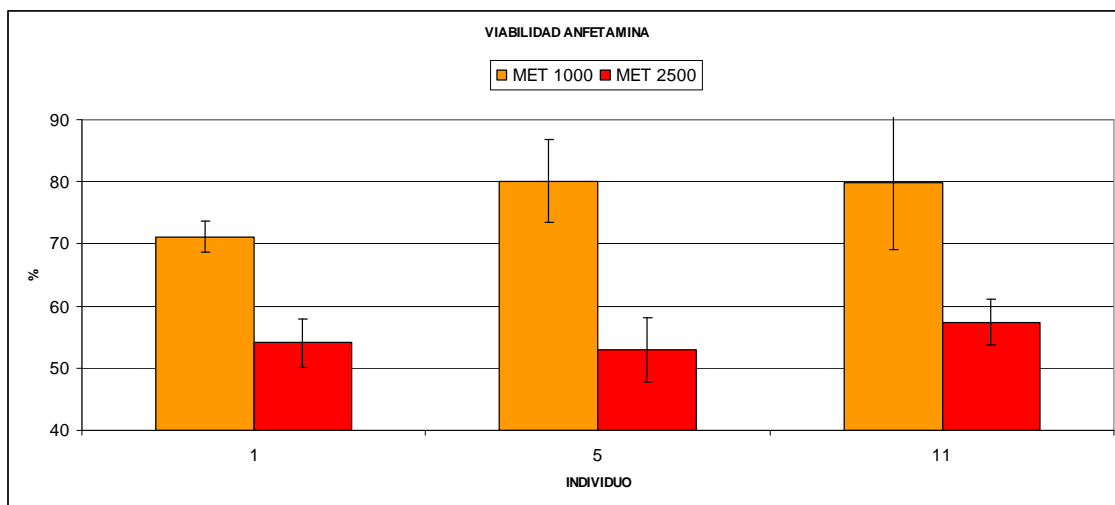


Fig 5. Efecto de la metanfetamina en la viabilidad de linfocitos tratados a dosis de 1000 y 2500 ng/ml en 3 individuos

7.2.2 Efecto sobre la proliferación celular (citostaticidad)

Se determinó el efecto de las anfetaminas sobre la proliferación celular (citostaticidad) de linfocitos aislados in vitro procedentes de tres individuos sanos a una concentración que no fuera citotóxica, empleando la técnica de bloqueo de la citocinesis con citocalacina B (Fenech 2000). El tratamiento fue realizado durante 48 horas con una concentración inicial de anfetamina y metanfetamina de 1000 ng/ml (6×10^{-6} M), empleando como control positivo arsénico a una concentración final de 10^{-5} M. Para evaluar la proliferación celular se determinó el índice nuclear. Los resultados se presentan en la **fig. 6** a la concentración evaluada de 1000 ng/ml.

N=3 individuos por triplicado

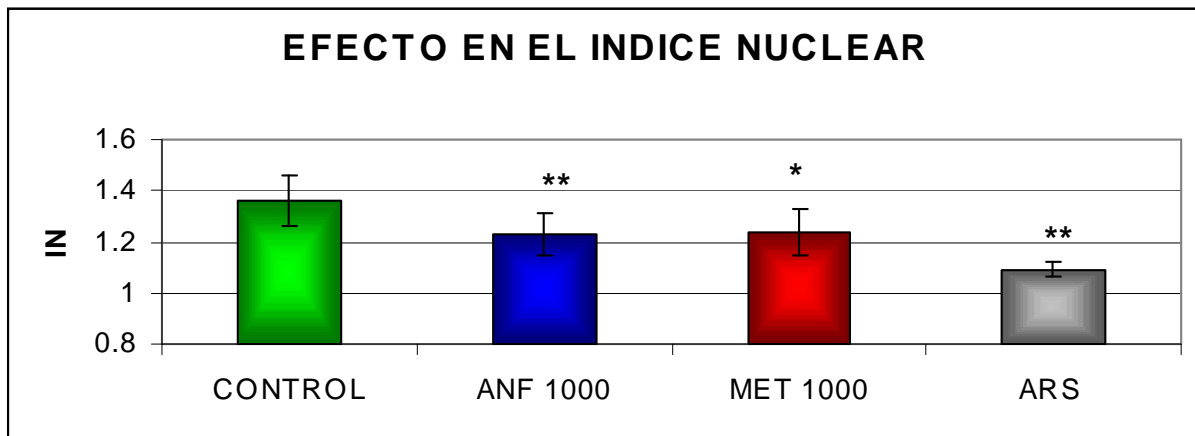


Fig 6. Efecto en la proliferación celular de linfocitos tratados con anfetamina (1000 ng/ml), metanfetamina (1000 ng/ml) y como control positivo arsénico (10 μ M). * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

7.2.3. Evaluación de genotoxicidad mediante micronúcleos

Se evaluó la genotoxicidad mediante la exposición de cultivos de linfocitos a anfetaminas, utilizando la técnica de micronúcleos como indicador. Esta técnica está basada en el bloqueo de la citocinesis de los linfocitos en proliferación con citocalacina B, y la búsqueda por microscopía de células binucleadas que contengan estructuras definidas como micronúcleos (Fenech 2000). Se evaluaron tres concentraciones distintas por triplicado y los resultados se presentan en la **fig. 7**. No se encontró diferencia significativa para ambas sustancias evaluadas a la concentración de 1000 ng/ml, a diferencia de la disminución significativa en la viabilidad y en la proliferación celular sin entrar en el intervalo citotóxico. Se observa mediante la desviación estándar que en la concentración de 2500 el intervalo de variación es mayor al compararlo con el del control, lo cual pudiera estar vinculado a la variabilidad individual.

N=3 individuos por triplicado

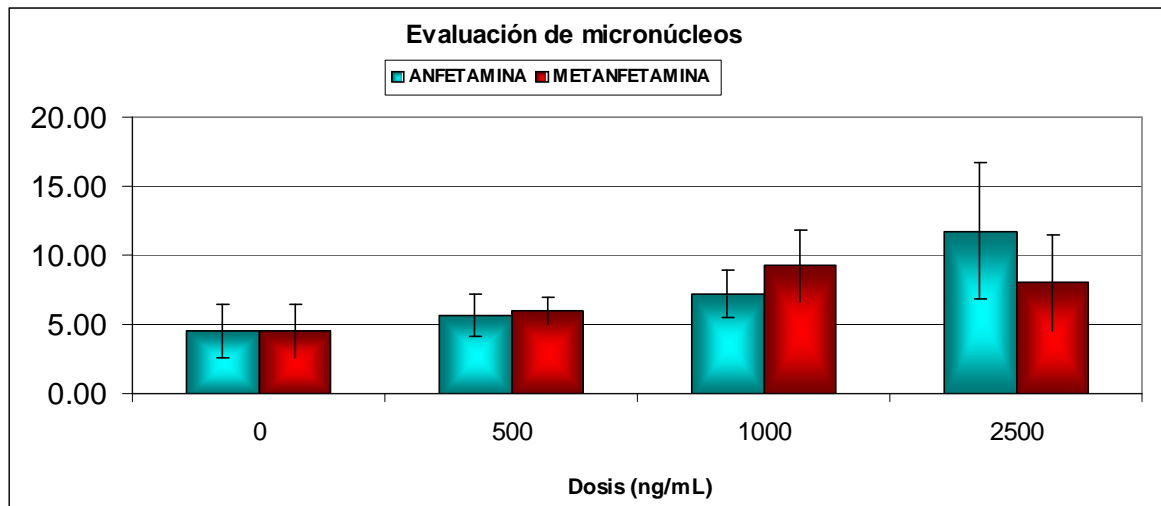


Fig 7. Evaluación de micronúcleos en linfocitos tratados a diferentes dosis de anfetamina y metanfetamina. * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

Un dato importante es que si pretendemos evaluar genotoxicidad, una de las recomendaciones es no trabajar en el rango citotóxico, por lo que para este grupo de individuos la dosis que se utilizó en los estudios adicionales fue de 1000 ng/mL que puede ser considerado como subtóxica.

Lo anterior se muestra claramente al graficar por separado cada individuo; para el caso de anfetamina, la Fig. 8 muestra que en el caso del individuo A encontramos diferencias significativas. En cuanto a metanfetamina, la Fig.9 nos muestra diferencias significativas para los individuos A y B.

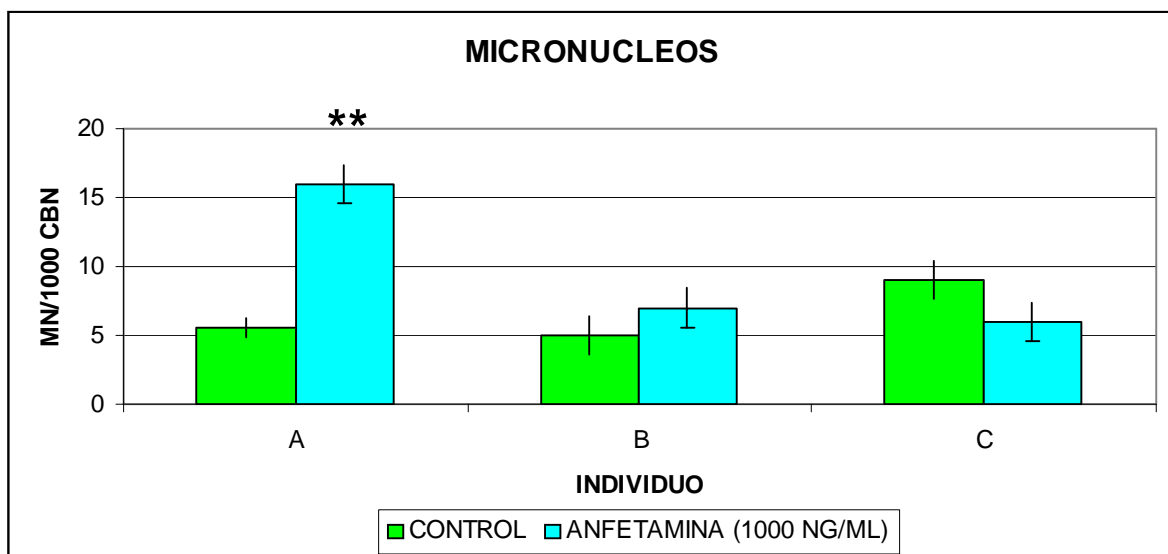


Fig 8. Evaluación de micronúcleos en linfocitos tratados con la dosis de 1000 ng/ml de anfetamina en tres individuos por triplicado * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

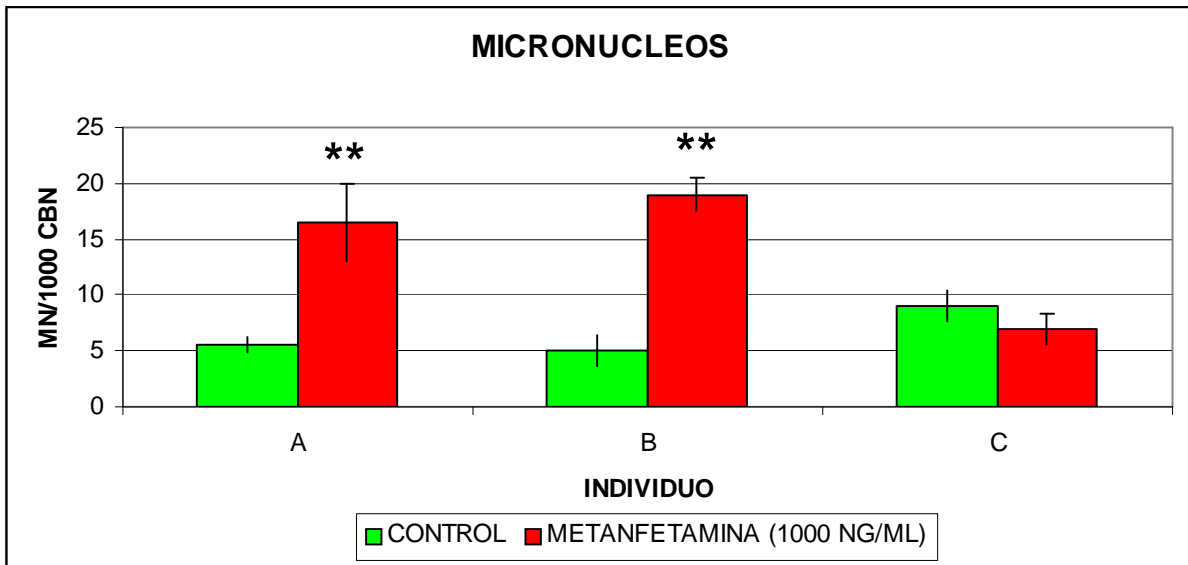


Fig 9. Evaluación de micronúcleos en linfocitos tratados con la dosis de 1000 ng/ml de anfetamina en tres individuos por triplicado * p<0.5 y **p<0.01

7.2.4. Evaluación de genotoxicidad mediante micronúcleos aumentando la n=7

Debido a las diferencias individuales observadas, se amplió la muestra de individuos, evaluándose cuatro individuos adicionales. En la **Fig 10** se muestran los datos de los efectos de las anfetaminas en los siete individuos evaluados, nos llama la atención la variabilidad existente, debido a que en algunos individuos se observa un incremento en el número de micronúcleos con respecto a los controles tal es el caso del 1, 3 y 7; en contraste, los individuos 4 y 5 presentaron una disminución del número de micronúcleos, y en los individuos restantes el cambio fue mínimo.

Estadísticamente solo dos de ellos resultaron con diferencias significativas.

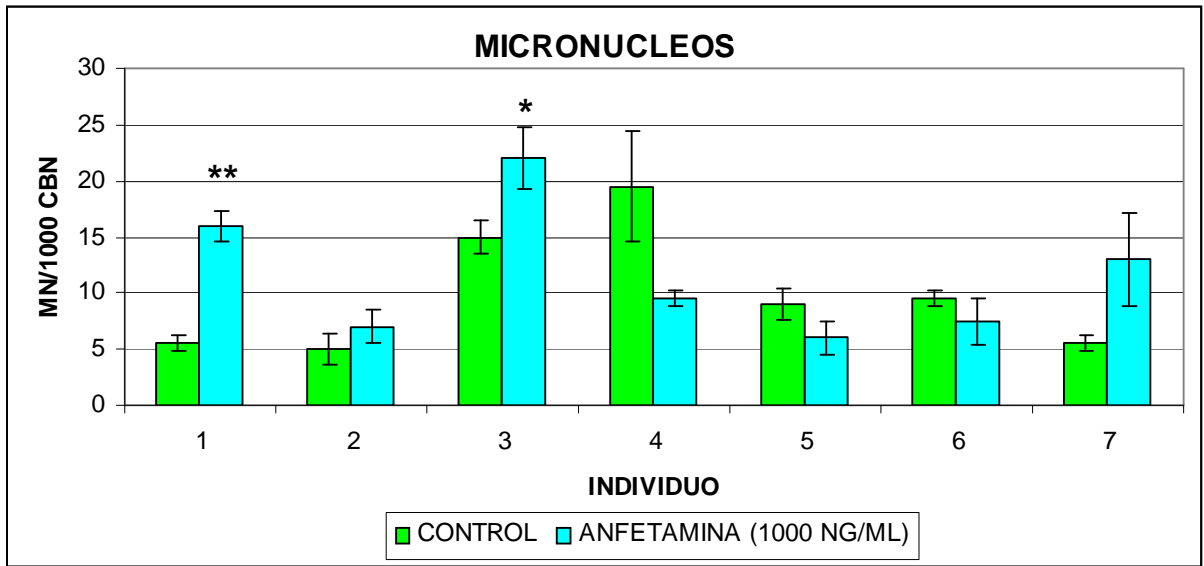


Fig 10. Evaluación de micronúcleos en linfocitos tratados con la dosis de 1000 ng/ml de anfetamina en tres individuos por triplicado * p<0.5 y **p<0.01

En el caso de la metanfetamina que se presenta en la **Fig. 11**, se observa que en los individuos 1, 2, 3, 7 se incrementó la frecuencia de micronúcleos de una manera significativa; por el contrario en el individuo 4 disminuyó el número aunque no de manera significativa.

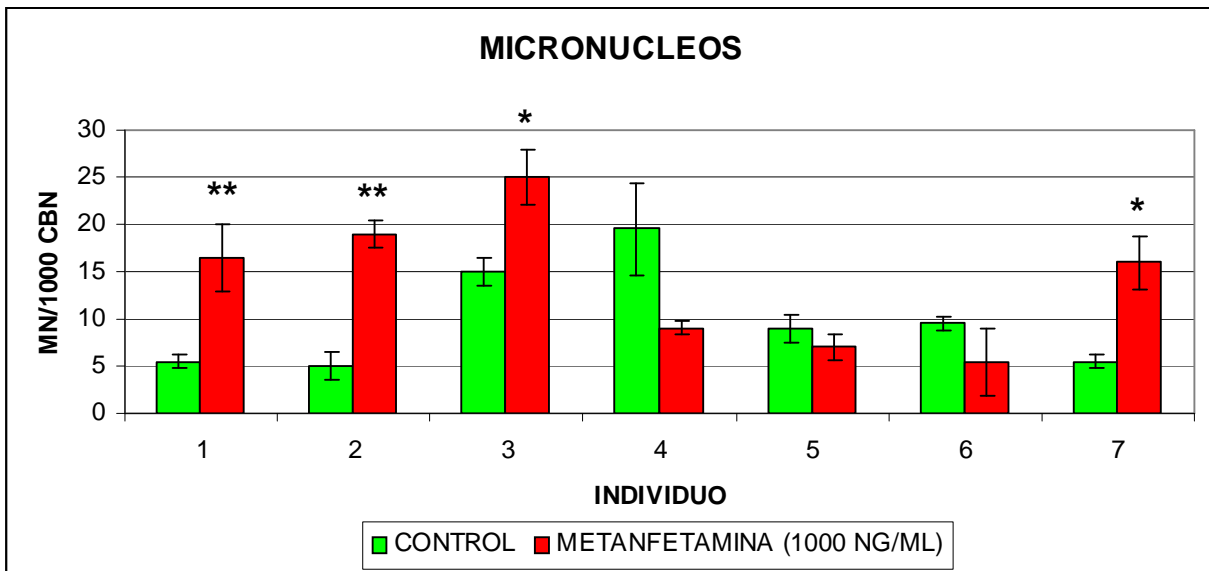


Fig 11. Evaluación de micronúcleos en linfocitos tratados con la dosis de 1000 ng/ml de anfetamina en tres individuos por triplicado * p<0.5 y **p<0.01

7.2.5. BUSCANDO EXPLICACIONES A LA VARIABILIDAD INDIVIDUAL

7.2.5.1. Evaluación de la capacidad del linfocito para metabolizar anfetaminas.

Para evaluar la capacidad que tenía el linfocito de metabolizar las anfetaminas, dado que contábamos con evidencias bibliográficas de la capacidad del linfocito de metabolizar xenobióticos, se analizó el medio de cultivo que contenía las células sonicadas después del tratamiento. Los resultados muestran que el porcentaje de la droga en el medio disminuye en diferentes proporciones (**fig. 12** y **fig. 13**), observándose diferencias entre individuos. Esta disminución corroboró la competencia metabólica de los linfocitos.

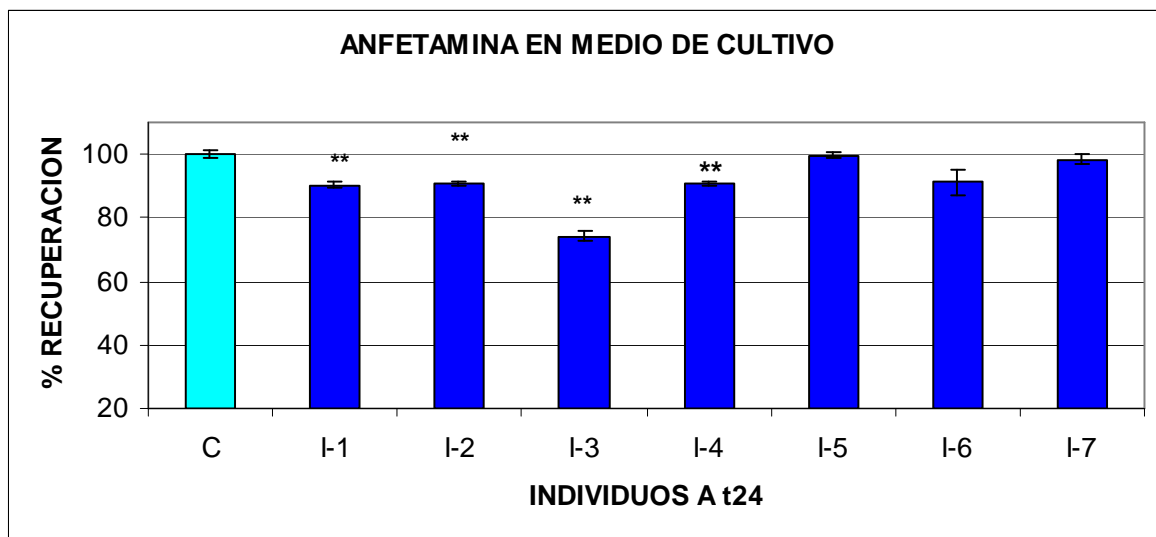


Fig 12. Cuantificación de anfetamina en sobrenadante de cultivo de linfocitos sonicados 24 horas después de tratamiento (1000 ng/ml). Se evaluaron siete individuos, to es el control sin linfocitos y el cual a las 24 horas tenía el 100% de la anfetamina. * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

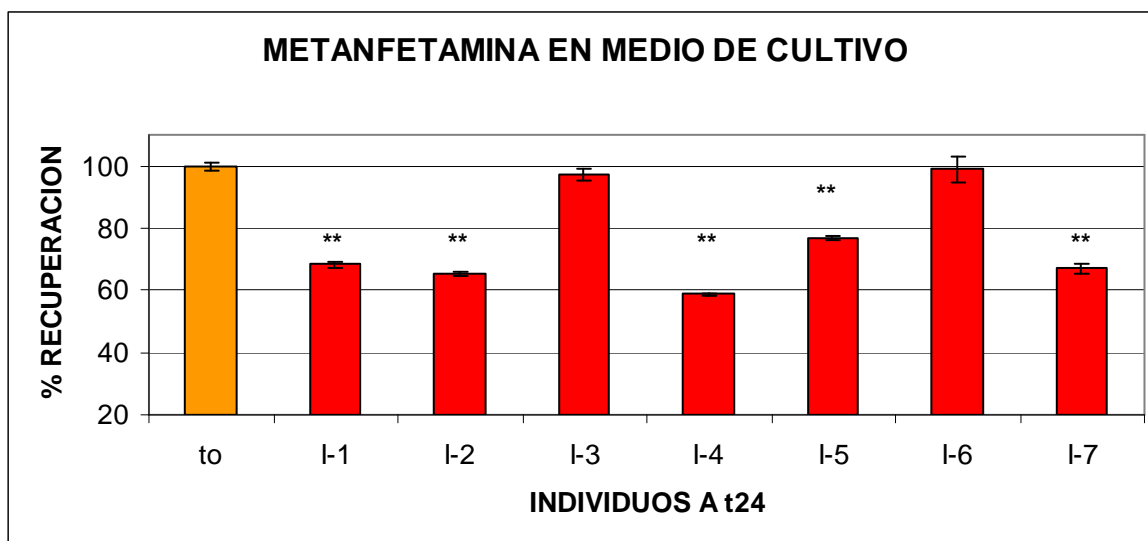


Fig 13. Cuantificación de metanfetamina en sobrenadante de cultivo de linfocitos sonicados 24 horas después de tratamiento (1000 ng/ml). Se evaluaron siete individuos, to es el control sin linfocitos y el cual a las 24 horas tenía el 100% de la anfetamina. * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$

Para comprobar el metabolismo, se buscó la presencia del metabolito hidroxilado utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como lo muestra la **Fig. 14**, donde se detectó la presencia del metabolito hidroxilado.

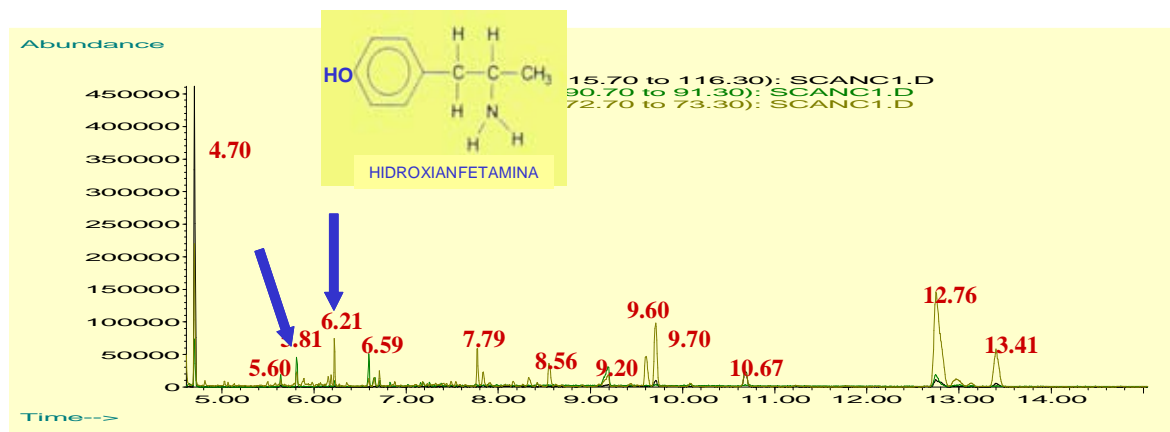


Figura 14.- Cromatograma obtenido del medio de cultivo de linfocitos tratados con anfetamina (1000 ng/ml).

Para corroborar inequívocamente la presencia del metabolito se diseñó un experimento empleando anfetamina marcada con deuterio. En la **Fig. 15** se muestra la presencia y confirmación del metabolito deuteriado.

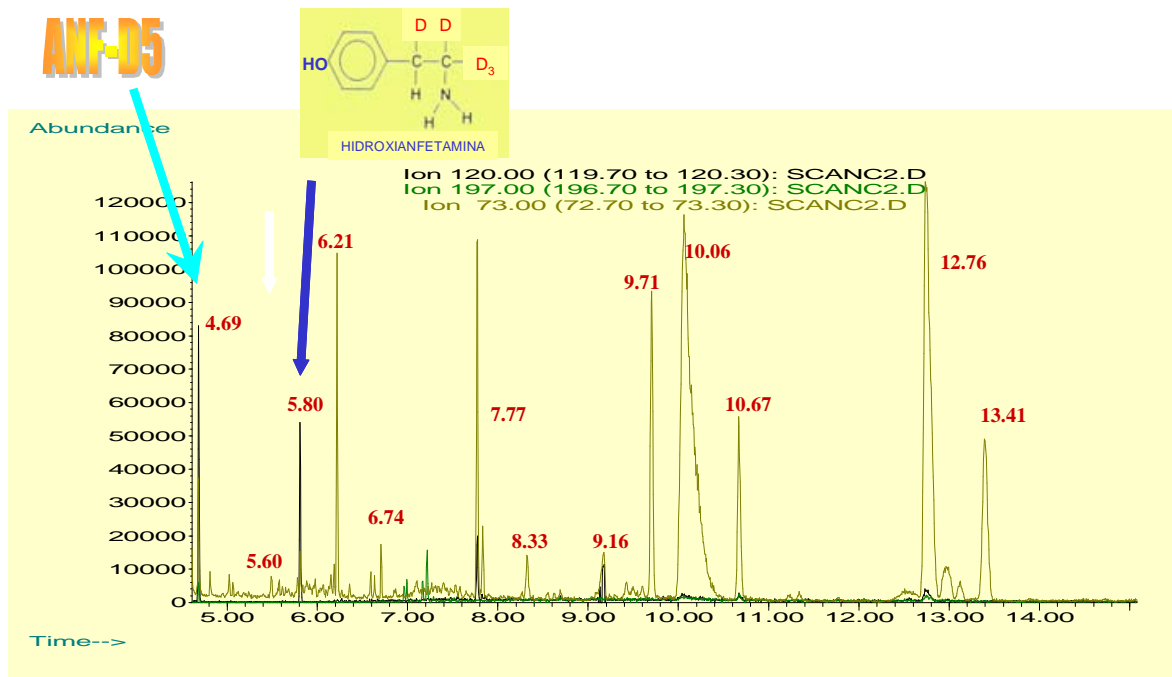


Figura 15.- Cromatograma obtenido del medio de cultivo de linfocitos tratados con anfetamina deuteriada. Se observa la presencia del pico nuevo a $t_r = 5.8$, el cual por medio de los iones que se analizaron se encuentra deuteriado.

7.2.5.2. Detección de la expresión del transcrito del gen CYP2D6

Lo anterior hizo necesario considerar el impacto del metabolismo de las anfetaminas en los siguientes experimentos. En el linfocito se han detectado CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP2D6 y CYP3A5. Aunque la presencia de estos CYP sugiere actividad enzimática, pocas han sido las sustancias cuyo metabolismo ha sido evaluado en los linfocitos (Raucy et al. 1999). En estudios realizados en ratas y en ratones se reporta que las anfetaminas son metabolizadas por el CYP2D6 (Law et al. 2000, Kreth et al. 2000, Lin et al. 1997). También las evaluaciones realizadas en sistemas in vitro con microsomas hepáticos o levaduras transgénicas señalan al mismo citocromo (Wu et al. 1997).

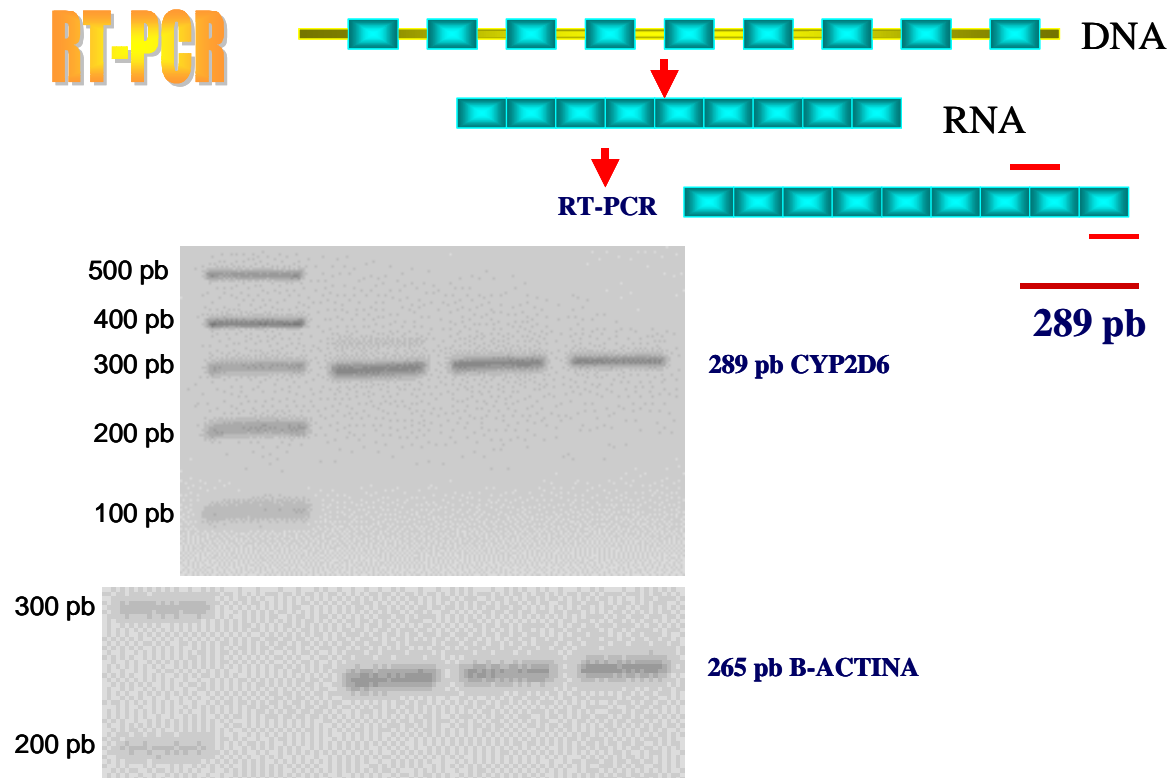


Figure 16.- Detección de la expresión de CYP2D6 en linfocitos.

La implicación de CYP2D6 en el metabolismo hizo necesario considerar el efecto de la existencia de polimorfismos en este citocromo (Tribut et al. 2002, Ingelman-Sundberg et al. 1999). Por lo menos cinco variantes alélicas han demostrado tener consecuencias para la función enzimática de la CYP2D6, además de una frecuencia de distribución diversa en la población humana. Para la determinación de algunos polimorfismos que han demostrado tener impacto en la actividad enzimática del CYP2D6, se emplearon técnicas basadas en la amplificación de fragmentos del gen CYP2D6 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente digestión con enzimas de restricción y evaluación de los fragmentos generados en geles de agarosa. El primer paso consistió en amplificar el gen CYP2D6 con iniciadores específicos para eliminar a los pseudogenes.

Tabla 2.- Genotipificación de variedades alélicas CYP2D6 de los 7 individuos evaluados

	GENOTIPO CYP2D6
3 INDIVIDUOS	*1/*1
3 INDIVIDUOS	*1/*2
1 INDIVIDUO	*2/*3

Como se puede observar en la **tabla 2**, se detectaron tres variedades alélicas asociadas con polimorfismos en los individuos analizados en experimentos anteriores encontrando tres homocigos variedad *1/*1, tres heterocigos con variedades *1/*2 y un heterocigo *2/*3. Se ha reportado que estas variedades alélicas tienen impacto en la actividad enzimática de otros sustratos de CYP2D6.

7.2.6. Relación genotipo CYP2D6 versus genotoxicidad

Para los siete individuos analizados se evaluó si existía alguna relación entre el genotipo CYP2D6 y la genotoxicidad; estos resultados se muestran en las **Figs. 17, 18 y 19**, donde se observó que los heterocigos *1/*2 y *2/*3 difieren de los controles al ser tratados con la anfetamina (**Fig. 17**) y solo los *1/*2 en el caso de metanfetamina (**Fig. 18**).

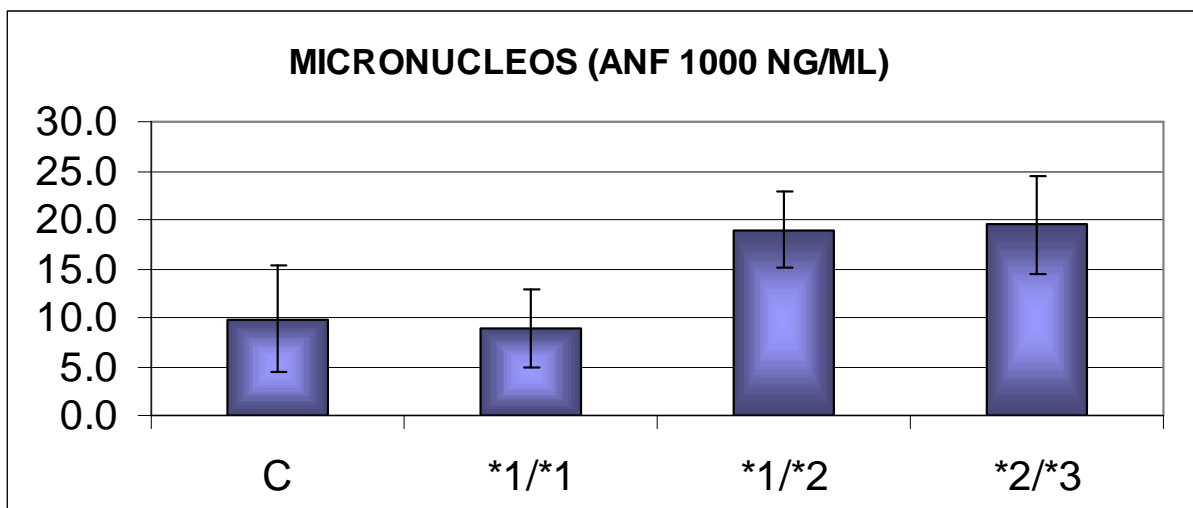


Fig 17. Comparación de variedades alélicas de CYP2D6 y su efecto en la formación de micronúcleos en linfocitos tratados con anfetamina (1000 ng/ml). Se evaluaron 3 individuos para *1/*1, 3 individuos para *1 / *2 y 1 individuo para *2/ *3.

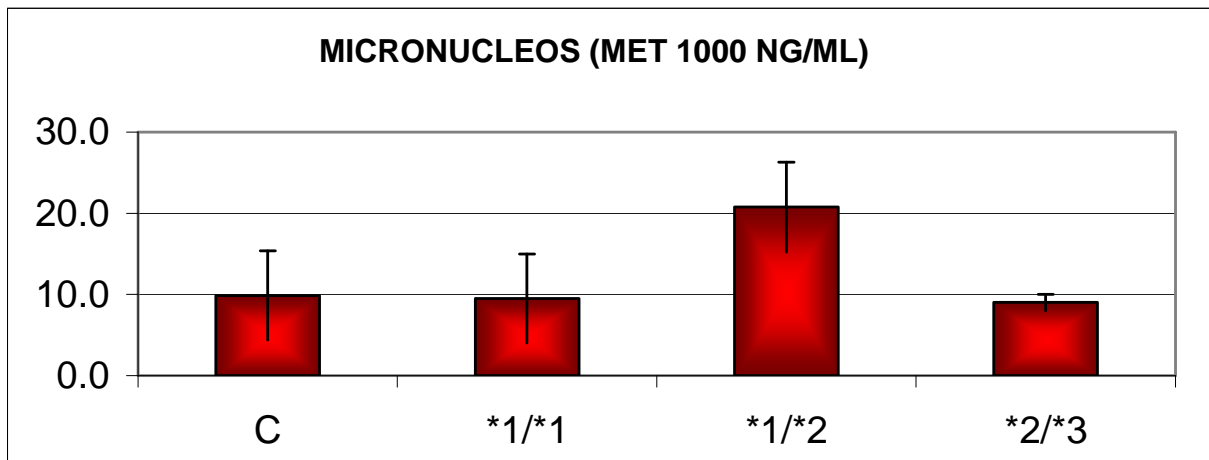


Fig 18. Comparación de variedades alelicas de CYP2D6 y su efecto en la formación de micronúcleos en linfocitos tratados con metanfetamina (1000 ng/ml). Se evaluaron 3 individuos para *1/*1, 3 individuos para *1 / *2 y 1 individuo para *2/ *3.

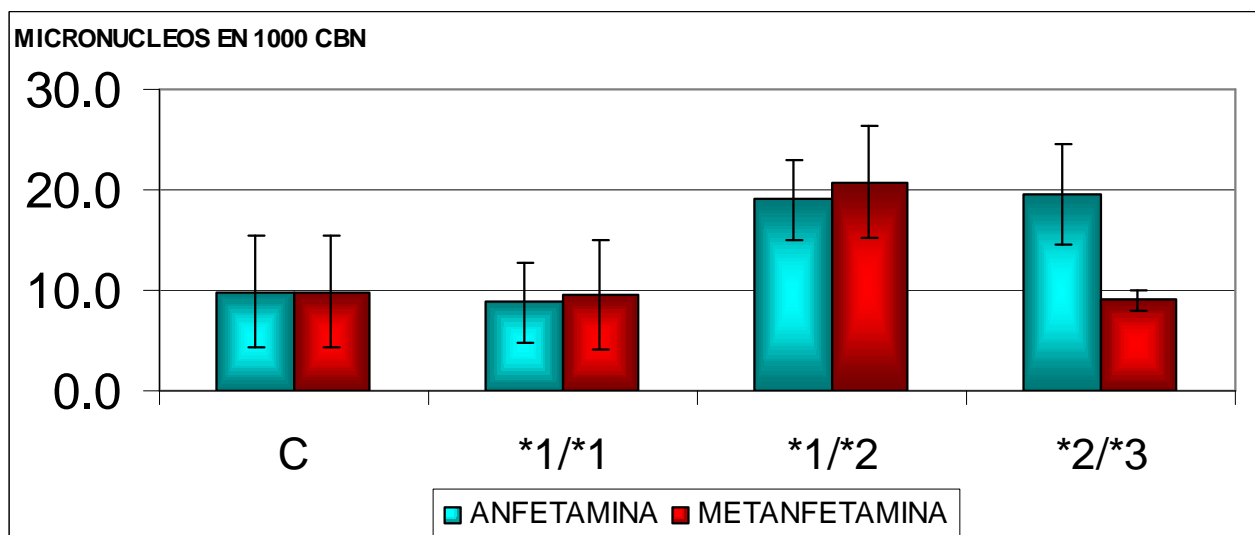


Fig 19. Comparación de variedades alelicas de CYP2D6 y su efecto en la formación de micronúcleos en linfocitos tratados con anfetamina y metanfetamina (1000 ng/ml). Se evaluaron 3 individuos para *1/*1, 3 individuos para *1 / *2 y 1 individuo para *2/ *3.

7.2.7. Evaluación del % recuperado de anfetamina en sobrenadante y su relación con los genotipos detectados

La actividad enzimática en los linfocitos para metabolizar las anfetaminas se detectó mediante la cuantificación de ambas anfetaminas en el cultivo de linfocitos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, calculando el % recuperado y relacionándolo con los genotipos detectados. Los resultados son mostrados en las **Figs. 20** y **21** y se observa que para ambas anfetaminas la variedad alélica *1/*2 pudiera tener una mayor actividad enzimática medida a través del % de recuperación, aunque estadísticamente no se encontró diferencia significativa.

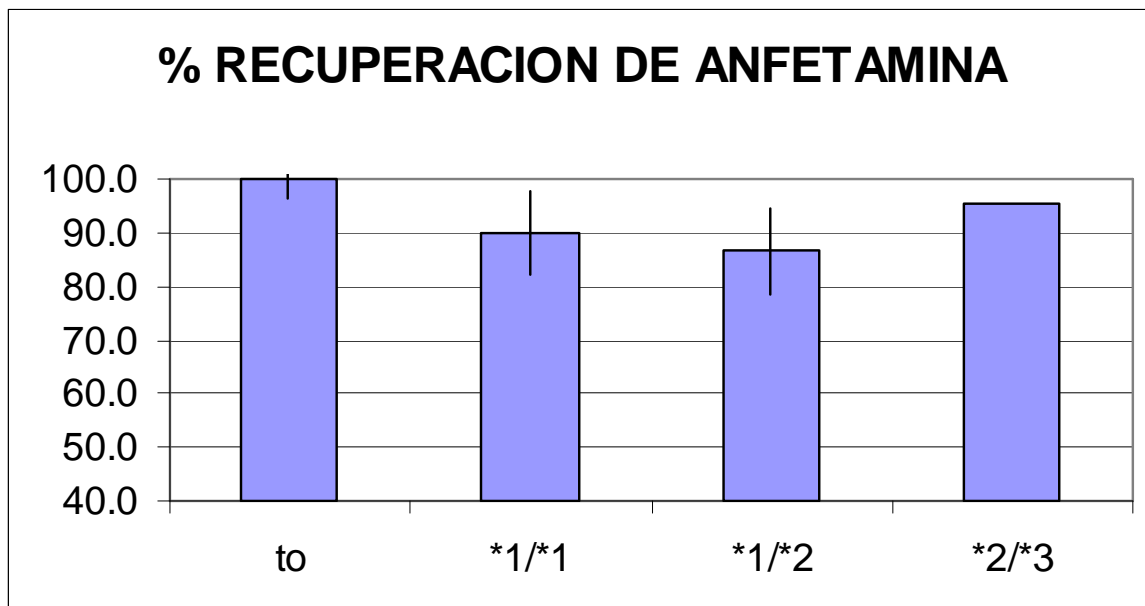


Fig 20. Cuantificación de anfetamina en sobrenadante de cultivo de linfocitos sonicados 24 horas después de tratamiento (1000 ng/ml). Se evaluaron 3 individuos para *1/*1, 3 individuos para *1 / *2 y 1 individuo para *2/ *3, to es el control sin linfocitos y el cual a las 24 horas tenía el 100% de la anfetamina.

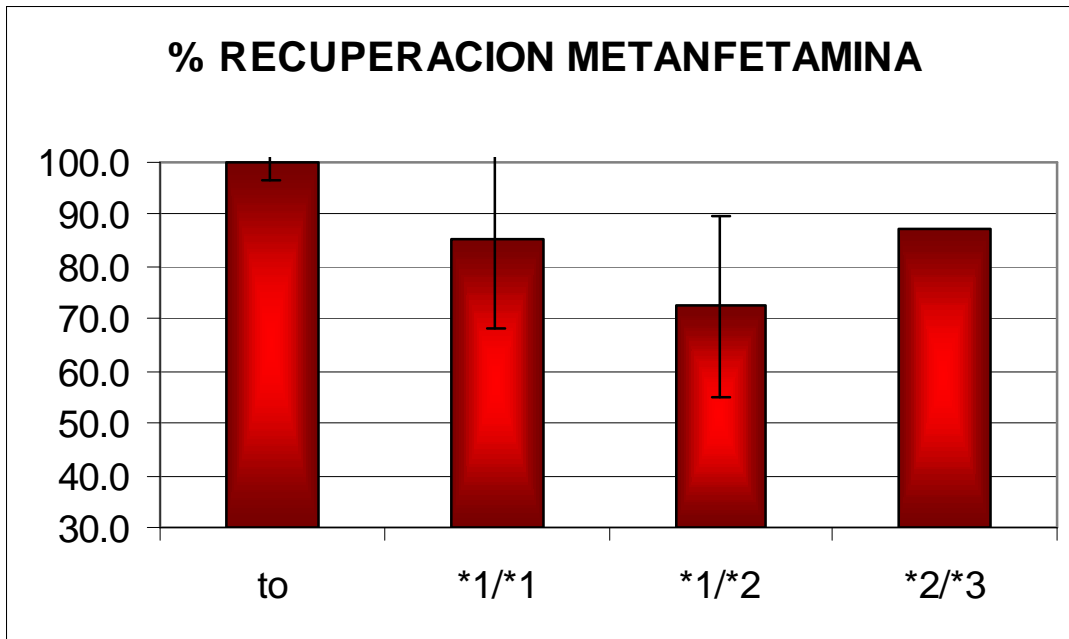


Fig 21. Cuantificación de anfetamina en sobrenadante de cultivo de linfocitos sonicados 24 horas después de tratamiento (1000 ng/ml). Se evaluaron 3 individuos para *1/*1, 3 individuos para *1 / *2 y 1 individuo para *2/ *3, to es el control sin linfocitos y el cual a las 24 horas tenía el 100% de la metanfetamina.

7.2.8. Dilucidando el posible mecanismo de acción

7.2.8.1. Evaluación de rompimientos de ADN mediante técnica cometa

En los individuos con genotipo *1/*2 se realizaron experimentos complementarios. El ensayo cometa fue empleado para evaluar rompimientos de una sola cadena para lo cual se evaluó el intervalo de concentraciones empleado en experimentos anteriores (500 a 2500 ng/mL), **Las Figs. 22 y 23** nos muestran un comportamiento dosis efecto para ambas sustancias, siendo mayor el daño al ADN en las concentraciones mayores, además de ser ligeramente mayor para el caso de metanfetamina.

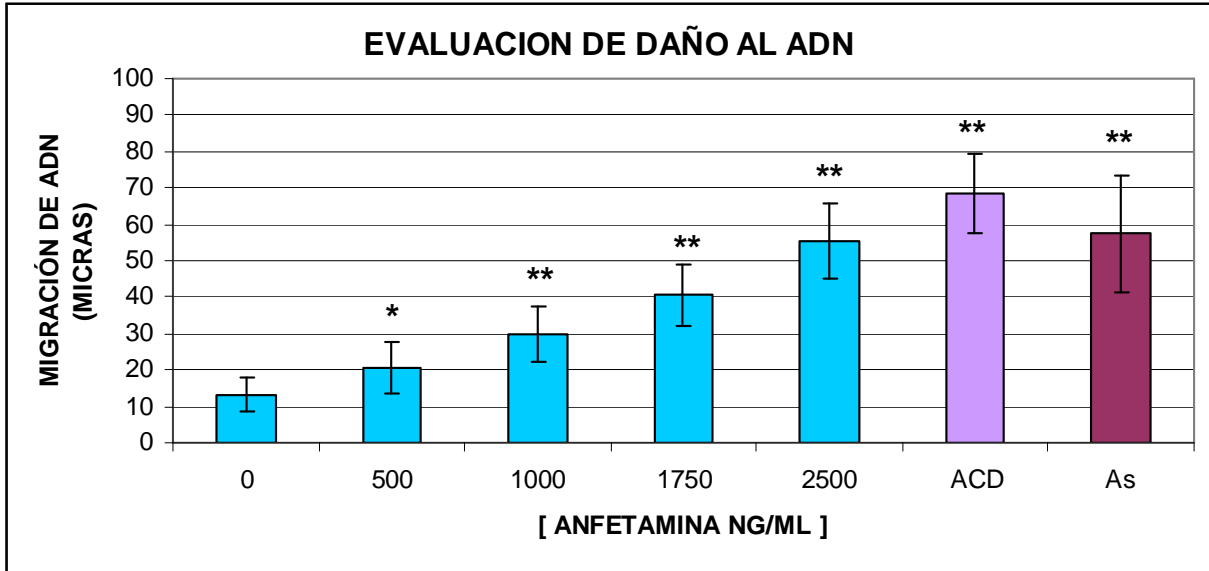


Figura 22.- Evaluación de daño al ADN, en cultivo de linfocitos tratados por 24h con dosis de [500, 1000, 1750 y 2500 ng/ml] de anfetamina. [0 ng/ml] es el control negativo sin tratamiento, actinomicina-D [0.075 µg/µl] y arsenito de sodio [5 µM] son controles con actividad genotóxica. Los tratamientos con anfetaminas mostraron efectos estadísticamente significativos ($p < 0.01$). Se determinaron 150 lecturas por tratamiento.

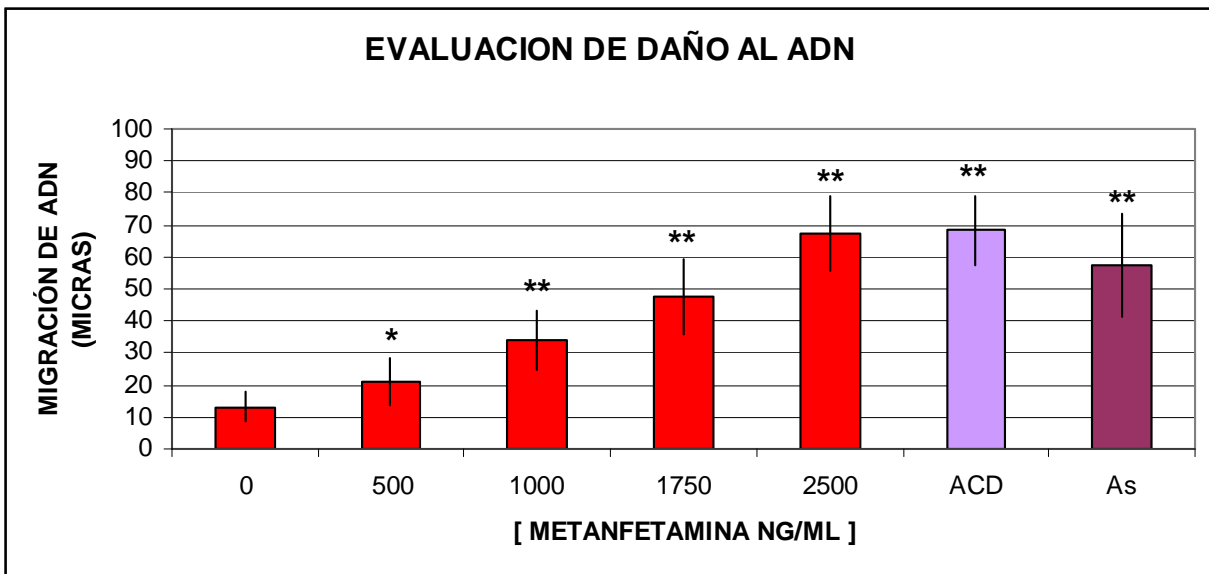


Figura 23.- Evaluación de daño al ADN, en cultivo de linfocitos tratados por 24h con dosis de [500, 1000, 1750 y 2500 ng/ml] de metanfetamina., [0 ng/ml] es el control negativo sin tratamiento, actinomicina-D [0.075 µg/µl] y arsenito de sodio [5 µM] son controles con actividad genotóxica. Los tratamientos con anfetaminas y metanfetaminas mostraron efectos estadísticamente significativos ($p < 0.01$). Se determinaron 150 lecturas por tratamiento.

7.2.8.2. Evaluación de apoptosis

En modelos animales, principalmente en rata como describimos en la introducción se ha reportado la inducción de apoptosis en diferentes tipos de células y se planteó que ésta era producto de la formación de especies altamente reactivas como pueden ser los radicales libres. Por lo anterior, se determinó la inducción de apoptosis por ambas anfetaminas (1000 y 2500 ng/mL). Los resultados se muestran en la **Fig. 24**. La anfetamina induce apoptosis estadísticamente significativa a una concentración de 2500 ng/mL; en el caso de metanfetamina ambas concentraciones evaluadas resultaron significativas.

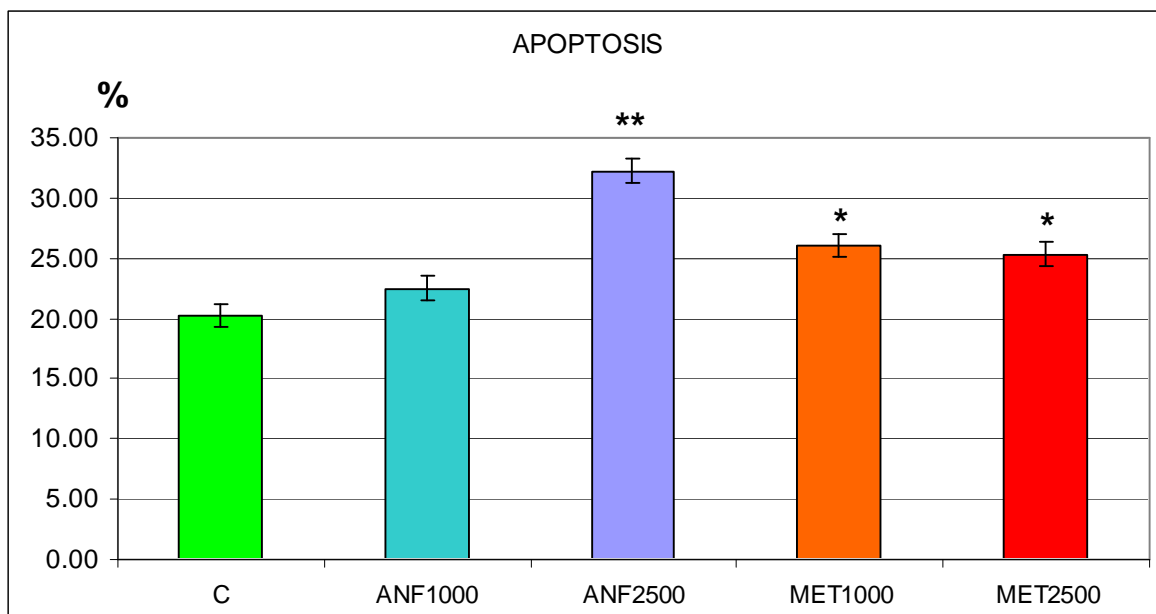


Figure 24.- Inducción de Apoptosis N=3 individuos por triplicado

7.2.8.3. Evaluación del efecto del pretratamiento con un antioxidante.

Datos recientes en rata han asociado la formación de radicales libres con el daño producido por las anfetaminas, así como la disminución del daño por el pretratamiento con antioxidantes. Por ello utilizamos las concentraciones de ambas anfetaminas que producían apoptosis y pretratamos con dimetilurea, un antioxidante que secuestra principalmente radicales del tipo hidroxilo. Los resultados obtenidos muestran la atenuación de la apoptosis (**fig. 25**); Lo anterior aporta evidencia

adicional de que en células humanas la formación de radicales libres por el tratamiento con anfetaminas puede ser el mecanismo por el cual se induce el rompimiento del ADN.

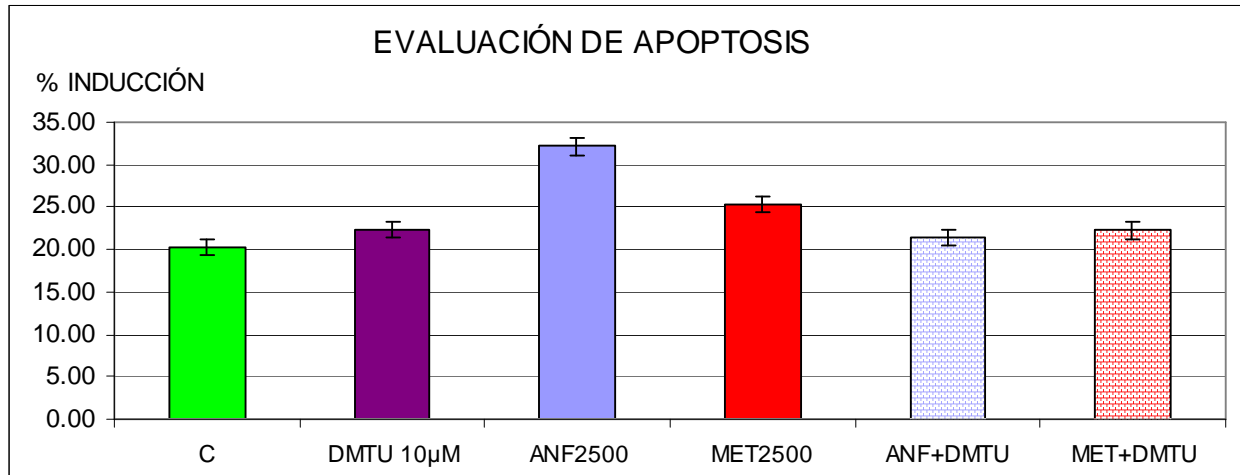


Fig 25. Efecto de la dimetiltiourea (DMTU) en la inducción de apoptosis de la anfetamina y metanfetamina N=3 individuos por triplicado.

8. DISCUSIÓN

En nuestro país el consumo de drogas se ha incrementado en los últimos años (ENA, 2002) y en muchos sectores es un serio problema no solo social, sino de salud y de seguridad, tal es el caso del sector carretero donde se detectó que la principal droga de consumo de los conductores de transporte público federal es la anfetamina (Tabla 1). Lo observado en este sector difiere del comportamiento en otros países, donde la principal anfetamina de consumo es la metanfetamina (www.oas.samsha.gov, European Monitoring Centre for Drugs Addiction). No está claro por qué los choferes en México prefieren la anfetamina, sin embargo, la explicación más sencilla pudiera ser porque la anfetamina está más disponible.

El que sea la anfetamina la sustancia más consumida por el transportista mexicano abre posibilidades de estudio a diferentes niveles, puesto que a nivel internacional la droga que más se ha estudiado es la metanfetamina (www.nida.gov).

En la primera fase de esta tesis se evaluaron las concentraciones de anfetamina, y su metabolito hidroxilado, en la orina de conductores del sector carretero en los que inicialmente se detectó el consumo de las mismas durante un operativo federal. Con las concentraciones encontradas se determinó el índice metabólico, pudiéndose clasificar a estos individuos en tres grupos como lo muestra la Fig. 1. Los grupos quedaron estratificados en metabolizadores rápidos (MR), metabolizadores intermedios (MI) y metabolizadores lentos (ML). Estos hallazgos pusieron en evidencia las diferencias individuales en el metabolismo de la anfetamina (Miranda et al., 2007).

Es importante señalar que los ML pueden presentar mayor riesgo de sobredosis y por consecuencia mayores efectos farmacológicos y toxicológicos. Las consecuencias que estas diferencias puedan tener en la conducción de automóviles y la frecuencia y severidad en los accidentes requieren ser estudiadas.

Las anfetaminas son metabolizadas por CYP450, fundamentalmente por el CYP2D6. Al comparar la distribución de los metabolizadores con la de otros sustratos de CYP2D6, se encontró que aunque las curvas de distribución son similares, hay diferencias entre los valores obtenidos. La curva de distribución metabólica para anfetamina (Fig. 2), mostró tener índices metabólicos o relación metabólica (RM) menores que los de debrisoquina (Ingelman-Sundberg et al., 1999) y los de dextrometorfano (Mc Elroy et al., 2000) que son dos sustratos típicos de CYP2D6. Estos datos aportan evidencia complementaria de que la relación metabólica (fenotipo) para CYP2D6 es

sustrato dependiente como algunos autores lo han encontrado en otros modelos celulares (Marcucci et. al., 2002). Lo anterior confirma la necesidad de determinar el fenotipo para cada sustrato de CYP2D6.

Cabe señalar que diversos autores enfocados a una medicina personalizada señalan la necesidad de determinar el fenotipo antes de la administración de un determinado fármaco, con el propósito de contar con los datos necesarios para ajustar la dosis del medicamento para cada individuo (Guttmacher et. al., 2003, Evans, et al., 1999). En el caso de la anfetamina, cuya utilidad terapéutica ha caído en desuso por sus efectos adictivos, la determinación del fenotipo tiene implicaciones relevantes para entender la toxicidad individual.

Basados en los hallazgos que se reportó Nishida, et.al., (2003) y con los datos obtenidos de la tabla 1, se calculó la concentración en sangre cuyo intervalo para la población evaluada fue de 100 a 5000 ng/mL. Con estos datos se estableció el marco de referencia de las concentraciones a las que están expuestos los transportistas estudiados y cuya toxicidad era de nuestro interés. Complicaciones éticas y legales limitan la evaluación toxicológica experimental en individuos sanos es por ello que una alternativa es la utilización de modelos animales in vivo o células in vitro. Para estudiar la toxicidad, se han empleado diversos modelos sobresaliendo la utilización de roedores (Imam et al., 2000, Huang et. al., 2002, Jayanthi, et al., 2004) ó de células humanas en cultivo como el linfocito (Gagnon et. al 1992).

Evidencias obtenidas de los modelos mencionados sugieren que las anfetaminas pudieran alterar el ciclo celular y dañar el material genético. Por ello se planteó la evaluación en cultivo de linfocitos humanos de los efectos citotóxicos y genotóxicos del tratamiento in vitro con las anfetaminas encontradas en los transportistas. Los efectos citotóxicos se presentan en la figura 3, donde se evaluaron cinco dosis de anfetamina y metanfetamina representativas de las concentraciones a las que se exponen los transportistas. Ambas sustancias disminuyeron la viabilidad celular en una relación dosis-efecto, siendo mayor el efecto de la metanfetamina. La determinación de la viabilidad es una prueba indirecta de la citotoxicidad de una sustancia, y los datos obtenidos mostraron que la metanfetamina es más citotóxica que la anfetamina, lo que concuerda con resultados obtenidos en otros modelos animales donde se ha evidenciado por ejemplo que la metanfetamina es más neurotóxica (Landenheim et. al., 2000). Llama la atención que se observaron diferencias individuales en los efectos sobre la viabilidad como lo muestran las figs. 4 y 5 para anfetamina y metanfetamina respectivamente.

Para evaluar la proliferación celular se determinó el índice nuclear descrito en la metodología (Fenech 2000). En la fig. 6 se observa que la concentración evaluada de 1000 ng/ml presenta diferencias significativas con respecto al control para ambas sustancias evaluadas, lo que nos indica que la anfetamina y la metanfetamina retardan la proliferación de los linfocitos en cultivo. Lo anterior corrobora lo descrito en un estudio donde se reporta una reducción de un 30% en la proliferación de linfocitos humanos tratados in vitro con anfetaminas (Gagnon et al. 1992).

Cabe mencionar que durante el desarrollo de esta fase del proyecto se publicó un artículo que mostraba la capacidad de la metanfetamina de inducir micronúcleos in vitro y en consumidores de metanfetamina en población china (Li. et. al., 2003). Por ello iniciamos la evaluación en nuestro modelo de la inducción de micronúcleos por ambas anfetaminas.

Los resultados presentados en la fig. 7 muestran que ambas anfetaminas son inductoras de MN. Los valores promedio de micronúcleos inducidos como grupo no presentan diferencia significativa. Sin embargo el análisis a nivel individual mostró diferencias en la sensibilidad a las anfetaminas de los diferentes individuos; por ejemplo, en la Fig. 8 se observa que en el individuo A la anfetamina induce micronúcleos en forma significativa. En cuanto a metanfetamina en la Fig.9 se observaron diferencias significativas en la inducción de micronúcleos en los individuos A y B. Debido a las diferencias individuales observadas se amplió la muestra de individuos, evaluándose la genotoxicidad en otros cuatro individuos. En la Fig 10 se muestran los datos de los efectos de las anfetaminas en los siete individuos evaluados. Llama la atención la variabilidad existente en los individuos 1, 3 y 7, en los cuales se observa un incremento en el número de micronúcleos con respecto a sus respectivos controles; en contraste, en los individuos 4 y 5 se observó una disminución del número de micronúcleos después del tratamiento con la anfetamina, y en los individuos restantes 2 y 6 no se observó ningún cambio entre los controles y los tratados. En el caso de la metanfetamina que se presenta en la Fig. 11, se observa que en los individuos 1, 2, 3, 7 se incrementó la frecuencia de micronúcleos de una manera significativa; por el contrario en el individuo 4 disminuyó el número aunque no de manera significativa.

Procurando entender las diferencias en sensibilidad a los efectos genotóxicos de las anfetaminas, se evaluaron las concentraciones de anfetaminas presentes en los cultivos al principio y al final de los experimentos, empleando para este propósito una técnica basada en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cual se desarrolló y validó. Se analizó el medio de cultivo que contenía las células sonicadas después del tratamiento. Los resultados muestran que el porcentaje de la droga en el medio de cultivo disminuye en diferentes proporciones (figs. 12 y 13),

observándose diferencias entre individuos. Esta disminución apoya la capacidad del linfocito de metabolizar xenobióticos (Raucy et.al., 1999).

Para comprobar que la disminución fuera producto del metabolismo, se buscó la presencia del metabolito hidroxilado utilizando la espectrometría de masas para identificarlo. La fig. 14 muestra que se detecta la presencia de los iones teóricos del metabolito hidroxilado. Un experimento adicional se planteó para corroborar inequívocamente la presencia del metabolito; el experimento consistió en el empleo de anfetamina marcada con isótopo de deuterio. En la fig. 15 se muestra la presencia y confirmación del metabolito, la cual se detectó mediante la conservación de la marca de deuterio.

En el linfocito se han detectado CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP2D6 y CYP3A5. Aunque la presencia de estos CYP sugiere actividad enzimática, pocas han sido las sustancias cuyo metabolismo ha sido evaluado en los linfocitos (Raucy et al. 1999). En estudios realizados en ratas y en ratones se reporta que las anfetaminas son metabolizadas por el CYP2D6 (Law et al. 2000, Kreth et al. 2000, Lin et al 1997). También las evaluaciones realizadas en sistemas in vitro con microsomas hepáticos o levaduras transgénicas señalan al mismo citocromo (Wu et al. 1997). En este trabajo se empleó una técnica para detectar la presencia del transcrito de CYP2D6 en los linfocitos de nuestro modelo de estudio (Rodríguez., et al. 2001). En la fig. 16 se puede observar la confirmación de que en los linfocitos humanos evaluados el gen del CYP2D6 se expresa.

La implicación de CYP2D6 en el metabolismo hizo necesario considerar el efecto de la existencia de polimorfismos en este citocromo, por lo menos cinco variantes alélicas han demostrado tener consecuencias para la función enzimática de CYP2D6, además de una frecuencia de distribución diversa en la población humana (Tribut et al. 2002, Ingelman-Sundberg et al. 1999). Para la determinación de algunos polimorfismos que han demostrado tener impacto en la actividad enzimática del CYP2D6, se emplearon técnicas basadas en la amplificación de fragmentos del gen CYP2D6 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente digestión con enzimas de restricción. También fue necesario amplificar el gen CYP2D6 con iniciadores "primers" específicos para eliminar a los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 y que éstos no influyeran en la detección de los polimorfismos. En la tabla 2 se presentan las tres variedades alélicas asociadas con polimorfismos y que se encontraron en los individuos analizados, tres homocigots variedad *1/*1, tres heterocigots con variedades *1/*2 y un heterocigoto *2/*3. Se ha reportado que estas variedades alélicas tienen impacto en la actividad enzimática de otros sustratos de CYP2D6 (Marcucci., et. al. 2002).

El contar con el genotipo (variedades alélicas) de los siete individuos analizados nos permitió evaluar si existía relación entre la variedad alélica de CYP2D6 y la genotoxicidad encontrada en los experimentos. Las Figs. 17, 18 y 19 muestran que los heterocigos $*1/*2$ y $*2/*3$ difieren de los controles al ser tratados con la anfetamina (Fig. 17). Para el caso de la metanfetamina solo $*1/*2$ presentó diferencias (Fig. 18). Lo anterior nos lleva a considerar la necesidad de evaluar la contribución de los polimorfismos de CYP2D6 en la genotoxicidad, lo que podría explicar parte de la variabilidad individual.

Considerando que en experimentos anteriores se había demostrado la competencia metabólica de los linfocitos y la presencia del transcrito de CYP2D6 se cuantificaron ambas anfetaminas en el cultivo de linfocitos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, calculando el % recuperado y relacionándolo con los genotipos detectados. Los resultados son mostrados en las Fig. 20 y Fig. 21 y se observa que para ambas anfetaminas la variedad alélica $*1/*2$ presenta una mayor actividad enzimática medida a través del % de recuperación. Aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas.

Con el propósito de entender estos hallazgos se plantearon experimentos que aportaran datos para elucidar el posible mecanismo de acción para la variedad alélica que mostró mayor susceptibilidad individual, para lo cual se realizaron experimentos complementarios en los individuos con genotipo $*1/*2$. El ensayo cometa fue una alternativa que se empleó para evaluar rompimientos de una sola cadena del ADN, evaluando el intervalo de concentraciones a que los conductores de transporte federal se exponen (500 a 2500 ng/mL). Las Figs. 22 y 23 muestran un comportamiento dosis efecto para ambas sustancias siendo mayor el daño al ADN en las concentraciones mayores, además de ser ligeramente mayor para la metanfetamina.

En modelos animales, principalmente en rata se ha reportado la inducción de apoptosis en diferentes tipos de células, planteándose que es producto de la formación de especies altamente reactivas como pueden ser los radicales libres (Huang, 2002, Imam 2001). En nuestro modelo se determinó la inducción de apoptosis por ambas anfetaminas utilizando dos concentraciones, 1000 y 2500 ng/mL. Los resultados se muestran en la Fig. 24 y confirman que la anfetamina induce apoptosis a una concentración de 2500 ng/mL, siendo estadísticamente significativa. En el caso de la metanfetamina ambas concentraciones evaluadas resultaron estadísticamente significativas.

Dado que la formación de radicales libres podría ser el mecanismo por el cual las anfetaminas produjeran el daño al DNA, utilizamos las concentraciones de ambas anfetaminas que producían apoptosis y se pretrataron los cultivos con dimetiltiourea, un antioxidante que secuestra

principalmente radicales del tipo hidroxilo. Los resultados obtenidos muestran la atenuación de la apoptosis (fig. 25), aportando evidencia adicional de que en células humanas la formación de radicales libres por el tratamiento con anfetaminas podría ser el mecanismo por el cual se induce el rompimiento del ADN, lo que podría explicar la citotoxicidad y relacionarse con el retraso en la proliferación celular. Para el caso de la genotoxicidad se debe considerar un factor clave que es la variedad alélica. En nuestros experimentos la variable *2 fue mas susceptible, lo anterior es posible que tenga que ver con el mecanismo por el que se metabolizan las anfetaminas (Groot., et. al., 1997), pero para corroborar y apoyar esta nueva hipótesis se requieren estudios orientados hacia el mecanismo de acción.

9 CONCLUSIONES

1. En un estudio en 109 individuos que resultaron positivos al consumo de anfetamina se determinó el fenotipo mediante la distribución de la relación metabólica (RM). Los resultados mostraron una distribución en campanas sobrelapadas, típico de los polimorfismos del CYP2D6. Cinco mostraron ser metabolizadores lentos (ML); 90 fueron metabolizadores rápidos (MR) y 14 se comportaron como metabolizadores intermedios (MI).
2. El tratamiento *in vitro* de linfocitos humanos con anfetamina y metanfetamina mostró una disminución en la viabilidad con un comportamiento dosis-efecto. Las dosis mayores mostraron un claro efecto citotóxico. Así también ambas sustancias retardaron la cinética de proliferación de los linfocitos
3. Se encontró variabilidad individual en la respuesta genotóxica a ambas anfetaminas.
4. Se demostró que el linfocito tiene la capacidad de metabolizar las anfetaminas y que expresa el transcrito del gen CYP2D6. Así también se encontró que las muestras de sangre evaluadas presentaban diferentes variantes alélicas.
5. Se detectó que los heterocigos que tienen el alelo *2 presentaron una mayor sensibilidad a los efectos genotóxicos
6. Ambas anfetaminas inducen apoptosis en los linfocitos siendo más clara la inducción por la metanfetamina. Esta inducción de apoptosis se pudo revertir con el empleo de dimetiltiourea, un protector contra radicales libres de tipo hidroxilo.
7. Los datos obtenidos indican que los efectos genotóxicos causados por ambas anfetaminas son producidos por radicales libres emanados de la hidroxilación de las anfetaminas por el CYP2D6 y que los polimorfismos de este último contribuyen a las diferencias observadas en la sensibilidad individual a las anfetaminas.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aklillu E. Persson I. Bertilsson L. Rodriguez F. Ingelman-Sundberg M. "Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in a black African population carrying duplicated and multiduplicated function CYP2D6 alleles detection", *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 278:441-446 (1996).
- Ames, B.N. "Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer", *Science* 204: 587-593 (1979).
- Armstrong M. Fairbrother K. Idle J.R. Daly A.K. "The cytochrome P450 CYP2D6 allelic variant CYP2D6J and related polymorphisms in a European population", *Pharmacogenetics* 4:73-81 (1994).
- Barceloux G., "Medical Toxicology Diagnostic and Treatment oh Human Poisoning", Elsevier, 626-639 (1988).
- Bates, G., Lehrach H., "Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease", *Bioessays* 16: 277- 284 (1994).
- Beckett A.H., Rowland M. "Urinary excretion of methylamphetamine in man", *Nature* 206: 1260 (1965).
- Bertilsson L. Dahl M. Sjoqvist F. Aberg-Wistedt A. Humble M. Johansson I. Lundqvist E. Ingelman-Sundberg M."Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine", *Lancet* 341: 63-70 (1993).
- Bertz R.J. and Granneman G.R. "Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions", *Cli. Pharmacokinet.*, 32:210-258 (1997).
- Carcillo J.A., Parise R.A., Adedoyin A., Frye R. Branch R.A., Romkes M. "CYP2D6 mRNA expresión in circulating peripheral blood mononuclear cells correlates with in vivo debrisoquine hydroxylase activity in extensive metabolizers", *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 91:149 (1996).
- Cody J.T. "Determination of methamphetamine enantiomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography B.*, 580:77-95 (1992).
- Cody J.T. "Specimen adulteration in drug urinalysis", *Forensic Sci. Rev.*, 2:63-75 (1990).
- Cox T.C., "Drug and abuse", *Adiction Research Foundation, USA*, 153-166, (1983).
- Dahl M.L. Johansson I. Bertilsson L. Ingelman-Sundberg M. Sjoqvist F." Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a swedish population: Analysis of the molecular genetic basis", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274:516-520 (1995).

- Dalen P. Dahl M.L. Ruiz M.L.E. Nordin J. Bertilsson L. "10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0,1,2,3 and 13 functional CYP2D6 genes", *Clin. Pharmacol. Ther.* 63:444-452 (1998).
- Dalen P. Frengell C. Dahl M.L. and Sjoqvist F. "Quick onset of severe abdominal pain after codeine in an ultrarapid metabolizer of debrisoquine", *Ther. Drug Monit.* 19:543-544 (1997).
- Daly A.K. Brockmoller J. Broly F. Eichelbaum M., Evans W.E. Gonzalez F.J. "Nomenclature for human CYP2d6 alleles", *Pharmacogenetics* 6:193-201 (1996).
- Davenport H. R. "La búsqueda del olvido: Historia global de las drogas, 1500-2000". Fondo de Cultura Económica. 1ª Ed., México, (2001).
- Davis J.M., Kopin I.J., Lemberger L. "Effects of urinary pH on amphetamine metabolism", *Ann N.Y. Acad Sci.* 179: 473 (1971).
- Demiglio M.R., Muroli M.R., Simile M.M., Calvisi D.F. "Implication of Bcl-2 family genes in basal and D-amphetamine induced apoptosis in preneoplastic and neoplastic rat liver lesions", *Hepatology* 31:956 (2000).
- Eichelbaum M. Baur M.P. Dengler H. J. Osikowska-Evers B.O. Tieves G. Zekorn C. "Chromosomal assignment of human cytochrome P450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22.", *Brit. J. Pharm.*, 23: 455-458 (1987).
- Eichelbaum M., Evans W., Yamazoe Y., "A tribute to Frank Gonzalez", *Pharmacogenetics* 11: 371, (2001).
- Encuesta Nacional de las Adicciones. "Capítulo de Otras Drogas", Secretaría de Salud, Mexico, (2002).
- Evan G. I., Vousden K.H., "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer", *Nature.* 411:342-348 (2001).
- Evans D. A. P., Mahgoub A. Sloan T.P., Idle J.R., Smith R.L. "A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white british population", *J. Med. Genet.*, 17:102-105 (1980).
- Evans W.E. Relling M.V., "XbaI 16-plus 9-kilobase DNA restriction fragments identify a mutant allele for debrisoquin hydroxylase: report of a family study", *Mol. Pharmacol.* 37:639-642 (1990).
- Evans W.E. and Relling M. V., " Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics", *Science.* 286: 487-500. (1999).
- Fadok VA, et al., "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages", *J. Immunol.*, 148: 2207-2216 (1992).

- Federal Register "Mandatory Guidelines for federal workplace drug analysis" Department of Health Service. (1994).
- Fenech M., "The in vitro micronucleus technique", *Mutation Research*, 455: 81-95 (2000).
- Ford H.L., Pardee A. B., "Cancer and the cell cycle", *J Cell Biochem*. 33:166-172 (1999)
- Gaedigk A., Blum M. Gaedigk R., Eichelbaum M. Meyer UA. "Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.* 48: 943-950 (1991).
- Gagnon, L. F. Lacroix, J. Chan and H.S. Buttar. "In vitro effects of designer amphetamines on human peripheral blood mononuclear leukocytes proliferation and natural killer cell activity", *Toxicol lett.*, 63:313-319 (1992).
- Gonzalez F.J. and Nebert D.W. "Evolution of the P450 gene superfamily", *Trends in Genetics*, 6:182-186 (1990).
- Gonzalez F.J., Skoda R.C., Kimura S., Umeno M., Zanger U.M., Nebert D.W., Gelboin H.V., Hardwick J.P., Meyer U.A. "Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism", *Nature*, 331: 442-446 (1988).
- Gough A.C. Miles J.S. Spurr N.K. Moss J.E. Gaedigk A. "Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus", *Nature* 347:773-776. (1990).
- Gough A.C., Smith C.A., Howell S.M., Wolf C.R., Bryant S.P., and Spurr N.K. "Localization of the CYP2d gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis", *Genomics*, 15: 430-432 (1993).
- Groot M.J., Bijloo G.J., Martens B.J., Van acker F.A., Vermeulen P.E., "A Refined Substrate Model for Human Cytochrome P4502D6", *Chem. Res. Toxicol.*, 10:41-48 (1997).
- Guidice J.M. Marez D. Sabbagh N. Legrand-Andreolletti M. Spire C. Alcaide E. Lafitte J.J, Broly F. Gonzalez F.J. Matsunaga T. "Evidence for CYP2D6 expression in human lung", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241:79-85 (1997).
- Guttmacher A.E., Collins, F.S. "Inheritance and Drug Response", *N. Eng. J. Med.*, 348: 529-537 (2003).
- Hakkola J. Raunio H. Purkunen R. Pelkonen O. Saarikoski S. Cresteil T. And Pasanen M. "Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy", *Biochem. Pharmacol.*, 52:379-383 (1996).
- Hanioka N, Kimura S. Meyer U.A. Gonzalez F.J. "The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site.", *Am. J. Hum. Genet.* 47:994-1001 (1990).

- Heim M.H. Meyer U.A. "Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6", *Genomics*, 14:49-58 (1992).
- Hengartner M.O., "The biochemistry of apoptosis", *Nature*, 407:770-776 (2000).
- Hiroi T. Chow T. Imaoka S. And Funae Y., "Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human", *Drug Metab. And Dispos.*, 30:970-976 (2002).
- Huang Z. Fasco M.J. and Kaminsky L.S., "Alternative splicing of CYP2D mRNA in human breast tissue.", *Arch. Biochem. Biophys.* 343:101-108 (1997).
- Huang K., Wang D., Hsu, K, Huang, T. Chen H., "free radicals mediate amphetamine-induced acute pulmonary edema in isolated rat lung", *Life Sciences*, 37:197-202 (2002).
- ICPEMC. "Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals.", *Mutation Research*, 144:117-177 (1983).
- Idle J.R., Mahgoub A., Lancaster R., Smith R.L., "Hypotensive response to debrisoquine and hydroxylation phenotype", *Life Sci.*, 22:979-984 (1978).
- Imam S.Z., Ali S. F., "Selenium, an antioxidant, attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity and peroxynitrite generation", *Brain Research*, 855: 186-199 (2000).
- Imam S.Z., Newport G.D., Itzhak V., Cadet J. L., Islam F., Slikker., Ali S.F., "Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or overexpressing copper-zinc superoxide dismutase", *J. Neurochem.*, 76:745-749 (2001).
- Ingelman-Sundberg M, et al., "Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment", *Trends Pharmacol Sci.* 20:342-9. (1999).
- Ingelman-Sundberg M, Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity, *Pharmacogenomics J.* 5:6-13 (2005).
- Ingelman-Sundberg M. Oscarson M. And McLellan R.A. "Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment", *Trends Pharmacol. Sci.* 20:342-349 (1999).
- Islam M.W., Shabanah O.A., Alharbi M.M. and Gharably N.M.."Evaluation of teratogenic potential of khat (*Catha edulis*)", *Drug Chem Toxicol.*, 17: 51 (1994).
- Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C., "Programmed cell death in animal development", *Cell*, 88:347-354 (1997).
- Jayanthi S., Deng X., Pierre antoine H., Landheim N. B., Cadet J. L.," Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria dependent death cascades", *The FASEB Journal*, 18:238-251 (2004).

- Johansson I., Lundqvist E. Bertilsson L., Dahl M.-L., Sjoqvist F., Ingelman-Sundberg, M., "Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90:11825-11829 (1993).
- Johansson I. Oscarson M. Yue Q. Y. Bertilsson L. Sjoqvist F. Ingelman Sundberg M. "Genetic analysis of the chinese cytochrome P450D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation", *Mol. Pharmacol.*, 46:452-459 (1994).
- Johnson D.G. and C.L. Walker "Cyclins and cell cycle checkpoints", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 295 (1999).
- Kagimoto M. Heim M. Kagimoto K. Zeugin T. Meyer U.A. "Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes.", *J. Biol. Chem.*, 265:17209-17214 (1990).
- Kalow W. "The metabolism of xenobiotics in different populations". *Canad J. Physiol. Pharm.*, 60:1-12 (1982).
- Katzung B.G., "Farmacología Básica y Clínica", *El Manual Moderno*, 6ª Ed., 585-588, (1996)
- Kawashima H. And Strobel H.W. "cDNA cloning of three new forms of rat brain cytochrome P450 belonging to the CYP4F subfamily", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:1137-1144 (1995).
- Kimura S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer U.A., Gonzalez F.J. "The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: séquense ad identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and pseudogene", *Am. J. Hum. Genet.*, 45: 889-904 (1989).
- Koopman G. et al., "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis", *Blood.* 84:1415-1420 (1994).
- Kreth K.P., Kovar K. A., Schwab M. and Zanger U.M.."Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism "ecstasy" related designer drugs", *Biochem. Pharmacology*, 59:1563 (2000).
- Kroemer H.K. Eichelbaum M. "Molecular basis and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism", *Life Sciences*, 56:2285-2298 (1995).
- Landenheim B., Krasnova I.N., Deng X., Oyler J.M. "Methamphetamine induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6", *Mol. Pharmacol.*, 58:1247 (2000).

- Law M.Y. and Moody D.E., "Urinary excretion of 4-hydroxiamphetamine and amphetamine in male and female Sprague-Dawley and Dark Agouti rats following multiple doses of amphetamine", *Toxicology letters*, 117:139 (2000).
- Law M.Y., Slawson M.H. and Moody D.E., "Selective Involvement of cytochrome P450 2D subfamily in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat", *Drug Metabolism and Disposition*, 28(3):348 (2000).
- Lewin B. "Genes VII" Oxford University Press, United States of America (2000).
- Lewis D.F.V. "Cytochromes P450 Structure and Function". Taylor & Francis, New York, (2001).
- Lewis D.F.V. and Hlavica P. "Interactions between redox partners in various cytochromes P450 systems: functional and structural aspects", *Biochimica et Biophysica acta*, 1460:353-374 (2000).
- Li J.H. and Lin L.F., "Genetic toxicology of abused drugs", *Mutagenesis*, 13: 557 (1998).
- Li J.H., Hu H.C., Chen W.B., Lin S. K., "Genetic toxicity of methamphetamine in vitro and in human abusers", *Environ. Mol. Mutagen.*, 42:233-242 (2003).
- Lin J.H. and Lu A.Y.H., "Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 Enzymes", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:535-67 (2001).
- Lin L. Y., Distefano E.W., Schmitz D.A., Hsu L., Ellis S.W., Lennard M.S., Tucker G.T. and Cho A.K., "Oxidation of methamphetamine and Methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6", *Drug Metabolism and Disposition*, 25:1059 (1997).
- Lowndes N.F. and Murguia J.R. "Sensing and responding to DNA damage", *Curr. Opin. Gene. Develop.*, 10:17 (2000).
- Lundqvist E., Johansson I., Ingelman-Sudberg M., "Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes", *Gene*, 226:327-338 (1999).
- Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., Lancaster R., Smith R.L. "Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man", *Lancet II*:584-586 (1977).
- Marcucci K.A. Pearce R.E. Crespi C. Steimel D.T. Leeder J.S. and Gaedigk A. "Characterization of cytochrome P450 2D6.1 (CYP2D6.1) CYP2D6.2, and CYP2D6.17 activities toward model CYP2D6 substrates dextromethorphan, bupropion, and debrisoquine", *Drug Metab. Dispos.*, 30:595-601 (2002).
- MCDDA. (European Monitoring Centre for Drugs Addiction). Annual on the State of the Drugs Problems in the European Union, (2002).

- McElroy S., Richmond J., Lira M., Friedman D., Silber M., Milos P.M., "CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting" *AAPS PharmSci.* 2(4):1-11 (2000).
- Miranda-G. E., Ostrosky-Wegmann P. "Bases científicas de las respuestas idiosincráticas en la terapéutica", *Acta Medica Grupo Angeles*, 2:59-63 (2004).
- Morgan D. O., "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:261-291 (1997).
- Nebert D.W., "Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?", *Am. J. Hum. Genet.*, 60:265-271 (1997).
- Nebert D.W., Russell, "Clinical importance of the cytochromes P450", *The Lancet* 360:1155-1162 (2002).
- Nebert D.W., Nelson D.R., Adesnik M., Coon M.J. Estabrook R.W. Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W. Phillips I.R., Sato R. and Waterman M.R., "The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci", *DNA* 8:1-13 (1989).
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J, Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.. "Cytochrome P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature", *Pharmacogenetics* 6:1-42 (1996).
- Nishida M., Namera A., "Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography–mass spectrometry and on-column derivatization" *J. Chromatography* 789:65-71 (2003).
- Niznik H.B. Tyndale R.F. Salle F.R. Gonzalez F.J. Hardwick J.P. Inaba T. And Kalow W. "The dopamine transporter and cytochrome P450lid1 (debrisoquine 4-hydroxylase) in brain: resolution and identification of two distinct [3H]GBR-12935 binding proteins", *Arch. Biochem. Biophys.* 276:424-432 (1990).
- Preston, R. J., Au, W., Bender, M.A. "Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assay", *Mutation Research*, 87:143-188 (1981).
- Raucy J.L. and Ingelman-Sundberg "Drug Metabolizing Enzymes in Lymphocytes", *J Biochem Molecular Toxicology*, 13:223 (1999).
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., Barbacid, M., "A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene", *Nature*, 300:149-152 (1982).
- Riedl S. J., Shi Y., "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis", *Nature Reviews*, 5:897-907 (2004).

- Rodríguez-Antona C., Donato M. T., Pareja Eugenia., Gomez M.J., "Cytochrome P-450 mRNA Expression in human Liver and its Relationship with Enzyme Activity", *Arch. Of Biochem. And Bioph.*, 393:308-315 (2001).
- Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M., Ostrosky-Wegman, "Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes", *Mutation Research*, 359:77-84 (1996).
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. "Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications", *Journal of Chromatography B*, 722:225-254 (1999).
- Romkes-Sparks M. Mnuskin A. Chern H.D. Persad R, Fleming C. Sibley G.N. Smith P. Wilkinson G.R. and Branch R.A., "Correlation of polymorphic expression of CYP2D6 mRNA in bladder mucosa and tumor tissue to in vivo debrisoquine hydroxylase activity", *Carcinogenesis*, 15:1955-1961 (1994).
- Sachse C., Brockmoller J., Bauer S., Roots I., "Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences", *Am. J. Hum. Genet.*, 60:284-295 (1997).
- Saxena R., Shaw G.L., Relling M.V., Frame J.N., Moir D.T., Evans W.E., Caporaso N., Weiffenbach B., "Identification of anew variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype", *Hum.Mol.Genet.*, 3:923-926 (1994).
- Schmidt I, "Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry", *Cytometry*, 13:204-208 (1992).
- Singh N.P., McCoy M. T., Tice R.R. Schneider L.E., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175:184-191 (1988).
- Skoda R.C., Gonzalez F.J. Demierre A. Meyer U.A. " Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene(P450c2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:5240-5243 (1988).
- Steiner E., Villen T., Hallberg M., Rane A., "Amphetamine secretion in breast milk" *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 27:123-124 (1984).
- Stumm G., Schlegel J., Schafer T., Wurs C., "Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons", *FASEB Journal*, 13:1065 (1999).
- Tice R. R., "The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans", *Stem Cells*, 13:207-214 (1995).
- Tribut O., Lessard V., Reymann J., Allain H., Bentue-Ferrer D., "Pharmacogenomics", *Med. Sci. Monit.*, 8:152-164 (2002).

- Tyndale R.F., Droll K.P., Sellers E.M., "Genetically deficient CYP2D6 metabolism provides protection against oral opiate dependence", *Pharmacogenetics* 7: 375-379 (1997).
- Valverde M., Lopez M.C., Lopez I., Sanchez I., Fourtoul T.I., Ostrosky-Wegman P., Rojas E., "DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City", *Environ Mol Mutagen*, 30:147-152 (1997).
- Van Heerde W.L., "The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. Trombosis and haemostasis", 73:172-179 (1995).
- Vaux D.L., Korsmeyer S.J., "Cell death in development", *Cell*, 96:245-254 (1999).
- Vermes I et al., "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V", *J. Immunol. Meth.*, 184:39-51 (1995).
- Weinstein I.B., Begemann M., Zhou P., Han E.K., Sgambato A., Doki V., Arber N., Ciaparrone M., Yamamoto H., "Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy", *Clin Cancer Res.*, 3:2696-2702, (1997).
- West W.L., Knight E.M., Pradhan S., Hinds T.S., "Interpatient variability:genetic predisposition and other genetic factors", *J. Clin. Pharmacol.*, 37:635-648 (1997).
- Wu D., Otton S.V., Inaba T., Kalow W., Sellers E.M., "Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6", *Biochemical Pharmacology* 53:1605 (1997).
- Yamazaki H. Kiyotani K. Tsubuku S. "Two novel haplotypes of CYP2D6 gene in a japanese population", *Drug Metab. Pharmacokin.*, 18:269-271 (2003).
- Zhou B.B., Elledge S.J., "The DNA damage response", *Nature*, 408:433 (2001).
- Zhou H. H., Koshakji R.P., Silberstein D.J., Wilkinson G. R., Wood A.J.J., "Racial Differences in drug reponse: altered sensitivity to and clearance of propranolol in men of chinese descente as compared with American whites", *New Eng. J. Med.*, 320:565-570, (1989).

Sitios de Internet consultados

- www.conadic.gob.mx
- www.imm.ki.se
- www.nida.nih.gov
- www.ornl.gov
- www.samsha.gov