



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DAÑO A DNA ASOCIADO A DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO DE D-ANFETAMINA Y  
METANFETAMINA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

L.B.D. LAURA QUETZALLY MEDINA VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Ana María Salazar Martínez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sara Frías Vázquez  
[Instituto Nacional de Pediatría](#)

Dr. Jorge Guerrero Camacho  
[Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía](#)

Ciudad de México, enero, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	11
DROGAS DE ABUSO.....	11
COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS.....	11
PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL GRUPO DE LOS COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS.....	12
LA FARMACOCINÉTICA DE LOS COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS .....	16
EFECTOS TÓXICOS DEL CONSUMO DE COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS .....	19
EL PAPEL DE LA FARMACOGENÓMICA EN EL METABOLISMO .....	19
CARACTERÍSTICAS DE LA SUPERFAMILIA DE ENZIMAS CITOCROMO P450 .....	20
DAÑO EN EL DNA POR AGENTES QUÍMICOS.....	23
ENSAYO DE MICRÓNÚCLEOS PARA EVALUAR LA GENOTOXICIDAD .....	24
EL PROCESO DE MUERTE CELULAR EN LA ELIMINACIÓN DEL DAÑO .....	25
LINFOCITOS COMO MODELO BIOLÓGICO .....	27
ANTECEDENTES DIRECTOS .....	27
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	29
<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	30
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	30
<b>METODOLOGÍA</b> .....	31
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	31
OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	31
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.....	31
DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE CYP2D6.....	32
OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE LINFOCITOS.....	32
TRATAMIENTO Y CULTIVOS DE LINFOCITOS.....	32
ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS Y PARÁMETROS DEL CITOMA POR BLOQUEO DE CITOCINESIS .....	34
EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD .....	35
NIVELES DE PROTEÍNAS GAMMA-H2AX, BCL2, BAX.....	35
FOSFORILACIÓN DE H2AX ANALIZADO POR INMUNOFUORESCENCIA.....	35

DETERMINACIÓN DE D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).....	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	39
IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS CON GENOTIPOS ASOCIADOS A UNA ACTIVIDAD BAJA Y NORMAL DE CYP2D6. ....	39
CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA.....	39
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PRO Y ANTIAPOPTÓTICAS (BCL <sub>2</sub> Y BAX) .....	41
ACTIVACIÓN DE GAMMA H2AX COMO MARCADOR DE DAÑO A DNA.....	43
EFFECTO CITOSTÁTICO INDUCIDO POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA. ....	44
EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA SOBRE OTROS PARÁMETROS ASOCIADOS A DAÑO CELULAR (CITOMA). ....	46
EFFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA.....	52
ACTIVACIÓN DE H2AX ANALIZADO POR INMUNOFLUORESCENCIA .....	54
DETERMINACIÓN DE D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).....	56
<b>DISCUSIÓN</b> .....	58
<b>CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>REFERENCIAS</b> .....	64

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto CONACYT-SSA/IMSS/ISSSTE-162122.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca dentro del programa de Becas Nacionales para cursar mis estudios de Maestría.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, por la beca otorgada en noviembre 2017 para la participación en el Congreso de la Sociedad Mexicana de Genética Humana.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los sinodales miembros del jurado de examen: Dr. Emilio Rojas, Dr. Javier Espinoza, Dra. Patricia Ramírez, Dr. Guillermo Elizondo y Dra. Adriana Mendoza, por sus observaciones y retroalimentación.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Sara Frías y Dr. Jorge Guerrero por acompañarme a través de este proceso, por cuestionarme, apoyarme y retarme.

A la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por el apoyo técnico brindado para la elaboración de esta tesis. Por compartir su experiencia y tener siempre una respuesta.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su apoyo en la determinación y cuantificación de D-anfetamina y Metanfetamina en la de la Unidad de Procedimientos Preparativos y de Acceso a Servicios de Proteómica, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde el 2011 me ha brindado la oportunidad de prepararme académica, deportiva, personal y profesionalmente.

A la Facultad de Química y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mi tutora de tesis la Dra. Ana María Salazar Martínez y a la Dra. Patricia Ostrosky Wegman por confiar en mí, por sus acertadas observaciones, por su paciencia y sus valiosas enseñanzas.

A todas las instituciones, organismos, archivos, bibliotecas, que de alguna manera contribuyeron a facilitarme el acceso a la información requerida para la elaboración de esta tesis. Un agradecimiento especial a Alexandra Elbakyan por contribuir a eliminar todas las barreras en el camino de la ciencia.

A ti, por ese beso, esa sonrisa, esa palabra, abrazo, regaño, guiño, compañía, amor, aliento, enseñanza, esa noche sin dormir, ese fin de semana en el laboratorio, ese baile de estrés, ese trago, carcajada, consulta psicológica, esos atracones. Que si estás leyendo esto es porque tú de alguna forma has contribuido a que este trabajo llegue a término y a que yo sea la persona que soy hoy. Infinitas gracias.

## **DEDICATORIA**

**Esta tesis está dedicada a todas las mujeres de mi vida, pero en especial a aquellas que se dedican a la ciencia. A todas mis sobrinas y a todas las niñas que sueñan con ser científicas. A todas aquellas mujeres sobrevivientes de violencia sexual a quienes hicieron creer que su vida estaría arruinada. Y a todas las mujeres que de forma directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo nombrarlas a todas sería imposible.**



**"Y ME TOCÓ ADMITIR QUE MUCHO DE QUIEN SOY, TAMBIÉN ES POR SOBREVIVENCIA.  
Y QUE IMPORTA. LO LOGRÉ. SOBREVIVÍ PARA VIVIR."**

XEM

**"ME PARO ANTE LOS SACRIFICIOS DE UN MILLÓN DE MUJERES ANTES DE MÍ  
PENSANDO QUÉ PUEDO HACER PARA QUE ESTA MONTAÑA SEA MÁS ALTA PARA QUE  
LAS MUJERES QUE VENGAN DESPUÉS DE MÍ PUEDAN VER MÁS ALLÁ."**

RUPI KAUR

## RESUMEN

Los compuestos anfetamínicos pertenecen al grupo de aminas simpaticomiméticas de acción indirecta, tienen actividad sobre el sistema nervioso central y un alto riesgo para producir dependencia y adicción. Los efectos neurotóxicos de estos compuestos han sido ampliamente estudiados, sin embargo, son controversiales los efectos mutagénicos, genotóxicos y carcinogénicos. Por otro lado, los compuestos anfetamínicos son principalmente metabolizados por la enzima CYP2D6 del complejo de citocromo P450. Se ha propuesto que la presencia de variantes alélicas funcionalmente inactivas conduce a un mayor riesgo de tener efectos adversos y toxicidad ante la exposición a compuestos que son metabolizados por la enzima CYP2D6. En un estudio realizado por este grupo de trabajo, se determinaron las concentraciones de anfetamina y su metabolito hidroxilado en la orina de consumidores; lo que permitió clasificar a esta población en metabolizadores lentos, intermedios y rápidos, sugiriendo la existencia de diferencias individuales en el metabolismo de la anfetamina.

El objetivo del trabajo fue demostrar que el daño en DNA inducido por D-anfetamina y metanfetamina depende del genotipo de CYP2D6. Para lo cual se genotipificó a CYP2D6 en 35 donadores de población abierta. El análisis de polimorfismos se realizó por medio de PCR en tiempo real usando sondas Taqman. Se seleccionaron 5 individuos metabolizadores extensos (ME) con genotipos CYP2D6\*1\*2 o CYP2D6\*1\*1, y 5 individuos metabolizadores intermedios (MI) con genotipos CYP2D6\*2\*4 o CYP2D6\*1\*4. Se realizaron cultivos de linfocitos y se trataron *in vitro* con 500, 1000 y 2500 ng/mL de D-Anfetamina y Metanfetamina durante 48 horas. Se evaluó la citotoxicidad mediante la tinción con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio. Se realizaron cultivos paralelos de linfocitos bajo las mismas condiciones para evaluar los niveles de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis (Bcl2 y Bax) por medio de Western blot. Se determinó la frecuencia de micronúcleos y análisis del citoma por medio de la técnica de bloqueo de la citocinesis, así como la evaluación de la proliferación celular a través de la determinación del índice de división nuclear. Se determinó la frecuencia de micronúcleos por medio de la técnica de bloqueo de la citocinesis La proteína H2AX fosforilada se evaluó por Western blot e inmunofluorescencia. Finalmente se cuantificó la Metanfetamina presente en los linfocitos mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC).

La citotoxicidad y genotoxicidad aumentaron en los linfocitos tratados con D-Anfetamina y Metanfetamina de los donadores con genotipo MI, en comparación con los linfocitos de los donadores con genotipo ME. La proliferación celular no fue afectada y no se observaron cambios en la expresión de Bcl2 y Bax. Sin embargo,

en los linfocitos de donadores MI tratados con los compuestos anfetamínicos se encontró aumentado el parámetro de necrosis (medido a través del análisis del citoma). Cuando los linfocitos fueron tratados con Metanfetamina, se encontró mayor concentración del compuesto dentro de los linfocitos de los donadores MI con respecto a los linfocitos de donadores ME.

Los resultados mostraron que los linfocitos de donadores MI, cuyo genotipo confiere menor funcionalidad de la enzima CYP2D6, tienen mayor susceptibilidad a los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos anfetamínicos. La aportación del trabajo es relevante en función de las consecuencias a largo plazo, ya que el porcentaje de la población mexicana cuyo genotipo corresponde a una función disminuida de CYP2D6 es cercano al 25% y se ha establecido una asociación entre el daño al DNA y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas.

## MARCO TEÓRICO

### DROGAS DE ABUSO

El rápido desarrollo de nuestras sociedades conlleva la aparición de una serie de problemas que vulneran la estabilidad de las familias y las comunidades, limitando la capacidad de las personas. Tal es el caso del uso de sustancias psicoactivas. El consumo del alcohol, de solventes inhalables, de productos de tabaco y de drogas ilegales representa un problema de salud complejo asociado a factores de riesgo cuyo abordaje requiere de información veraz y actualizada (ENCODE, 2014). Con respecto a los compuestos anfetamínicos, su aparición se documentó por primera vez en los noventa y se observa que su consumo incrementó significativamente. Según el informe mundial de drogas 2017 la droga ilegal de consumo más frecuente es la marihuana, seguida por la anfetamina y estimulantes tipo anfetamínicos con 35 millones de usuarios a nivel mundial (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). Los resultados de la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017 (ENCODAT, 2017) indican que, aunque el consumo de drogas ilegales en México aún es bajo comparado con el consumo de otros países, éste se encuentra en un crecimiento constante desde el 2002. Para algunas poblaciones los compuestos anfetamínicos son la droga de mayor consumo (SISVEA, 2016) sin embargo, a nivel nacional se encuentran en el tercer lugar sólo por debajo de la marihuana y la cocaína (Tabla 1) (ENA, 2011).

Tabla 1. Consumo de Drogas de Abuso

	Encuestas Nacionales de Adicciones			
	2002 %	2008 %	2011 %	2011 IC 95%
<b>Total</b>				
Mariguana	0.6	1.0	1.2	0.957-1.461
Cocaína**	0.3	0.4	0.5	0.351-0.643
Crack	***	0.1	0.1	0.033-0.193
Alucinógenos	***	0.1	0.1	0.010-0.146
Inhalables	0.1	0.1	0.1	0.049-0.194
Estimulantes tipo anfetamínico	***	0.1	0.2	0.068-0.233
Cualquier droga ilegal	0.8	1.4	1.5	1.229-1.782
Cualquier droga	1.3	1.6	1.8	1.529-2.120

Prevalencia de consumo de drogas en población total de 12 a 65 años. \*\*Cocaína también incluye crack. \*\*\* < 0.1 (ENA, 2011).

### COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS

Los compuestos anfetamínicos son sustancias psicoactivas con propiedades estimulantes, eufóricas, anoréxicas y en algunos casos alucinógenas e influyen en

las emociones del consumidor. Los compuestos con estructura anfetamínica derivan de la estructura central del b-feniletilamina y se caracterizan cinética y dinámicamente por atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, resistir la biotransformación cerebral y liberar neurotransmisores de monoamina a partir de las terminaciones nerviosas (Carvalho et al., 2012)

Los compuestos derivados de la anfetamina se utilizaron por primera vez comercialmente como un inhalador de venta libre para la congestión nasal y el asma. Hoy en día, la anfetamina se utiliza en el tratamiento del trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), narcolepsia con síndrome de fatiga crónica, como terapia complementaria para la incapacidad de experimentar placer asociada con la depresión y como tratamiento complementario para la obesidad (Haile et. al., 2009). La anfetamina también se utiliza de manera ilegal como un potenciador del rendimiento deportivo, potenciador cognitivo, y de manera recreativa como un afrodisíaco (Klee, 1997).

#### PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL GRUPO DE LOS COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS

Los compuestos anfetamínicos son bases débiles cuyas constantes de pKa oscilan alrededor 9.7 a 9.9, son producidas por medio de síntesis química en la industria farmacéutica o en laboratorios clandestinos. Pertenecen a la clase de fenetilamina. Es también el compuesto original de su propia clase estructural, los compuestos anfetamínicos sustituidos, que incluyen sustancias tales como bupropión, catinona, MDMA (éxtasis) y metanfetamina. Como miembro de la clase de fenetilamina, la anfetamina está también químicamente relacionada con los neuromoduladores de aminas traza de origen natural, específicamente fenetilamina y N-metilfenetilamina, ambas producidas dentro del cuerpo humano. La fenilamina es el compuesto original de la anfetamina (Hagel et al., 2012).

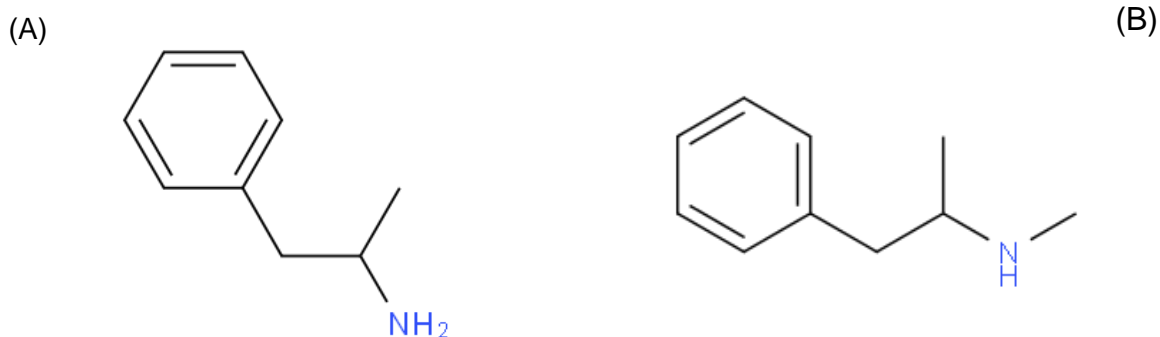


Figura 1. Estructura química de (A) D-Anfetamina y (B) Metanfetamina  
(www.chemspider.com)

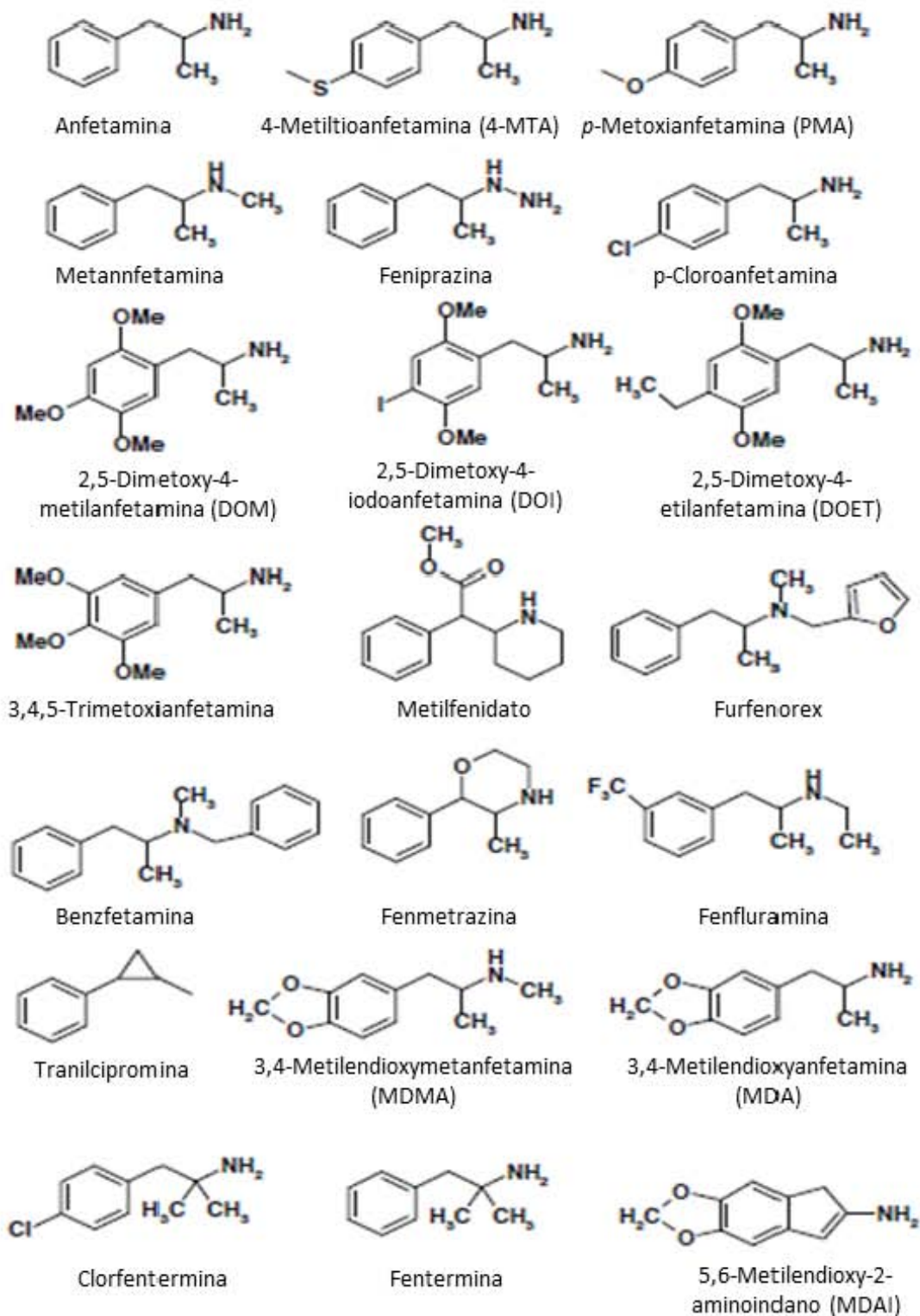


Figura 2. Estructuras químicas de los compuestos anfetamínicos sintéticos más representativos (Tomado de Carvalho, et. al., 2012).

Estructuralmente, la diferencia química entre la D-Anfetamina (Figura 1A) y la Metanfetamina (Figura 1B), 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. 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 (Carvalho et al., 2012).

En la actualidad el término anfetaminas incluye un grupo de compuestos relacionados estructuralmente como son: la Anfetamina, Metanfetamina, hidroxianfetamina e hidroximetanfetamina. Existen derivados de los compuestos anfetamínicos que han sido utilizados en el tratamiento de diversas patologías (Tabla 2).

Tabla 2. Fuentes farmacéuticas de anfetaminas, metanfetaminas y sus derivados.

Medicamento	Genérico	Propiedades y usos farmacológicos	
<b>Aderrall</b>	Anfetamina y Dextroanfetamina	Estimulantes del SNC que contribuyen en el control de la hiperactividad.	Es un medicamento combinado que se usa para el tratamiento de la <b>narcolepsia y TDAH</b> (Guohong & Foley, 2000).
<b>Dexedrine</b>	Dextroanfetamina	Aminas simpaticomiméticas no-catecolaminas, con actividad estimulante del sistema nervioso central y simpático. Entre sus acciones periféricas se incluyen elevación de la presión arterial sistólica y diastólica, broncodilatación débil y una acción estimulante respiratoria.	Fue aprobada para el tratamiento del <b>TDAH y la narcolepsia</b> en niños y adultos, y para ayudar a <b>reducir el peso</b> . Se ha encontrado más eficaz que los antidepresivos estándar para <b>aliviar la depresión</b> entre los pacientes con VIH y también puede aumentar su energía (Graybel, 1980; Ward, Kelly, Foltin, & Fischman, 1997).
<b>Desoxyn</b>	Metanfetaminahidrocloreto	Amina simpaticomimética con actividad estimulante del SNC. Otras acciones periféricas incluyen la elevación de la presión arterial sistólica y diastólica y broncodilatador débil y la acción estimulante respiratoria. Los fármacos de esta clase se utilizan comúnmente como <b>"anorexígenos"</b> .	<b>Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad:</b> Desoxyn se indican como una parte integral de un programa de tratamiento para un efecto estabilizador en niños mayores de 6 años de edad con un síndrome de comportamiento caracterizado por distracción moderada a severa, falta de concentración, hiperactividad, inestabilidad emocional y la impulsividad. <b>La obesidad exógena:</b> como tratamiento a corto plazo adjunto en un régimen de reducción de peso basado en la restricción calórica (Scheppers et al., 2003).

<b>Vicks inhaler</b>	l- metanfet amina	Vasoconstrictor simpaticomimético que aumenta la presión arterial y el consumo de oxígeno del miocardio.	Usado como <b>descongestionante nasal</b> (Morton & Hall, 1999).
<b>Aponeuron</b>	Anfetami nil, N- cianoben zilanfeta mina	Estimulante derivado de la Anfetamina. Es una profármaco de la Anfetamina.	Es usado para tratar la <b>obesidad, ADHD y narcolepsia</b> (Utrilla, 2000).
<b>Asenlix, Finedal o Rexigen</b>	Clobenzo rex	Análogo de la Anfetamina (aunque 20 veces menos potente) que produce la liberación de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina y serotonina.	Se usa como <b>supresor del apetito</b> . En su estructura química destaca la presencia de un sustituyente muy voluminoso en el grupo amino. Esta modificación disminuye la capacidad de crear dependencia y mantiene el efecto <b>anorexigénico</b> (Junet, 1956).
<b>Apetinil, Adiparthrol</b>	Etilanfeta mina	Estimulante de las clases químicas de fenetilamina y anfetaminas.	Utilizado como un <b>supresor del apetito o anorexígenos</b> en la década de 1950. (Schweizerischer Apotheker-Verein., 2000).
<b>Captagon, Biocapton y Fitton.</b>	Fenetilina	Es una unión química de Anfetamina y teofilina que se comporta como un profármaco para las dos drogas antes mencionadas.	Se comercializa para su uso como <b>psicoestimulante</b> (Kristen, Schaefer, & Von Schlichtegroll, 1986).
<b>IFA-DIETY* A.P.</b>	Fenpropo rex.	Derivado de la fenilisopropilamina con acción sobre los centros cerebrales de control del apetito y específicamente sobre el sistema reticular activador ascendente. Tiene propiedades lipolíticas que podrían favorecer la termogénesis y pérdida ponderal en el tratamiento de la obesidad.	<b>Anorexigénico</b> . Está indicado como auxiliar en el tratamiento de la obesidad exógena, asociado a un régimen dietético hipocalórico (Bray, 2000).
<b>Rondimen</b>	Mefenore x Metilfenet ilamina	Se incluye en la lista de compuestos estimulantes de acción central y / o alucinógenos.	Ha sido ampliamente demostrada la eficacia terapéutica de mefenorex como ayuda complementaria en el <b>tratamiento de la obesidad</b> por períodos limitados de tiempo, así como su capacidad para ser bien tolerados (Chan, Hsu, Tseng, & Chu, 2010).
<b>Didrex</b>	Benzafet amina	Amina simpaticomimética con actividad farmacológica similar a los compuestos anfetamínicos, fármacos de esta clase se utilizan en la obesidad.	Están indicados en el tratamiento de la <b>obesidad exógena</b> a corto plazo (unas semanas) adjunto en un régimen de reducción de peso basado en la restricción calórica en pacientes con un índice de masa corporal inicial (IMC) de 30 Kg/m <sup>2</sup> o superior que no han respondido para la reducción de peso régimen apropiado (dieta y/o ejercicio) solo (Boissier, Dumont, Ratouis, & Moisy, 1967).



<b>Metrotonin</b>	Dimetilan fetamina	Clase química relacionada con fenetilamina y anfetaminas.	Estimulante con menores efectos adversos que la anfetamina (Cheng, Mok, Chan, & Li, 2007).
<b>Gewodin, Gewolen</b>	Famprofa zone	Agente no esteroideo anti- inflamatorio (NSAID) de la serie pirazolona.	Tiene <b>efectos analgésicos, anti- inflamatorio, y efectos antipiréticos.</b> Famprofazona ha sido conocido para producir Metanfetamina como un metabolito activo, con 15 a 20% de una dosis oral de ser convertido a la misma (Amsterdam, 2003).
<b>Frugalan</b>	Furfenore x	Estimulante la cual produce metanfetamina como un metabolito, y ya no se comercializa, debido a posibles problemas con el abuso.	Usada como supresor del apetito (Frampton & Plosker, 2007).
<b>Eldepryl</b>	Selegilina	Pertenece a una clase de medicamentos denominados feniletilaminas. La selegilina es un derivado de la levometanfetamina con un grupo propargilo unido al átomo de nitrógeno.	Es un fármaco <b>antiparkinsoniano y antidepresivo</b> , utilizado para el tratamiento de las primeras etapas de enfermedad de <b>Parkinson, depresión y demencia senil</b> (Culpepper & Kovalick, 2008).

#### LA FARMACOCINÉTICA DE LOS COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS

Los compuestos anfetamínicos son un grupo muy homogéneo de fármacos con alta biodisponibilidad oral, alto volumen de distribución (alrededor de 4 L/Kg) y baja unión a proteínas plasmáticas (usualmente menos del 20%). La vida media de eliminación oscila entre 6 y 12 horas, y se realiza por vía renal y hepática. Aunque muchas anfetaminas se metabolizan ampliamente en el hígado, para varios de estos fármacos, un porcentaje significativo (55-70%) se excreta sin biotransformación previa (Kraemer & Maurer, 2002). Dado que químicamente, los compuestos anfetamínicos son fármacos básicos débiles (con valores de pKa alrededor de 9.9) y tienen peso molecular relativamente bajo, estos fármacos pueden cruzar fácilmente membranas celulares y capas lipídicas, alcanzando altos niveles en tejidos y fluidos biológicos con pH inferior a la sangre, incluyendo saliva y sudor (De La Torre et al., 2000).

**Absorción.** Los compuestos anfetamínicos se absorben en el tracto gastrointestinal, el máximo nivel plasmático se obtiene a las dos primeras horas y su completa absorción requiere de 4-6 horas, atraviesan libremente la barrera hematoencefálica, con mayor facilidad que otras aminas simpaticomiméticas de acción indirecta, lo que podría explicar los fuertes efectos a nivel del sistema nervioso (Rang et al., 2016).

**Distribución.** Se distribuyen prácticamente a todos los tejidos, manteniendo una mayor concentración en pulmón, hígado, cerebro, bazo y riñón. Tienen escasa unión

a proteínas plasmáticas (15 a 30%) y un elevado volumen de distribución (3.2-5.6 L/Kg) (Howland et al., 2006).

Metabolismo. Los compuestos anfetamínicos se metabolizan mediante seis procesos químicos; hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, desaminación oxidativa, N-oxidación y conjugación con el nitrógeno (Figura 3). La principal enzima encargada de su metabolismo es la enzima CYP2D6 del sistema de citocromo P450 (Law et al., 2000).

En particular, la Anfetamina es metabolizada por medio de hidroxilación, mientras que la Metanfetamina se metaboliza principalmente a través de N-desmetilación para producir Anfetamina e hidroxilación aromática para formar 4-hidroximetanfetamina tales reacciones son mediadas por la enzima CYP2D6 (Carvalho et al., 2012).

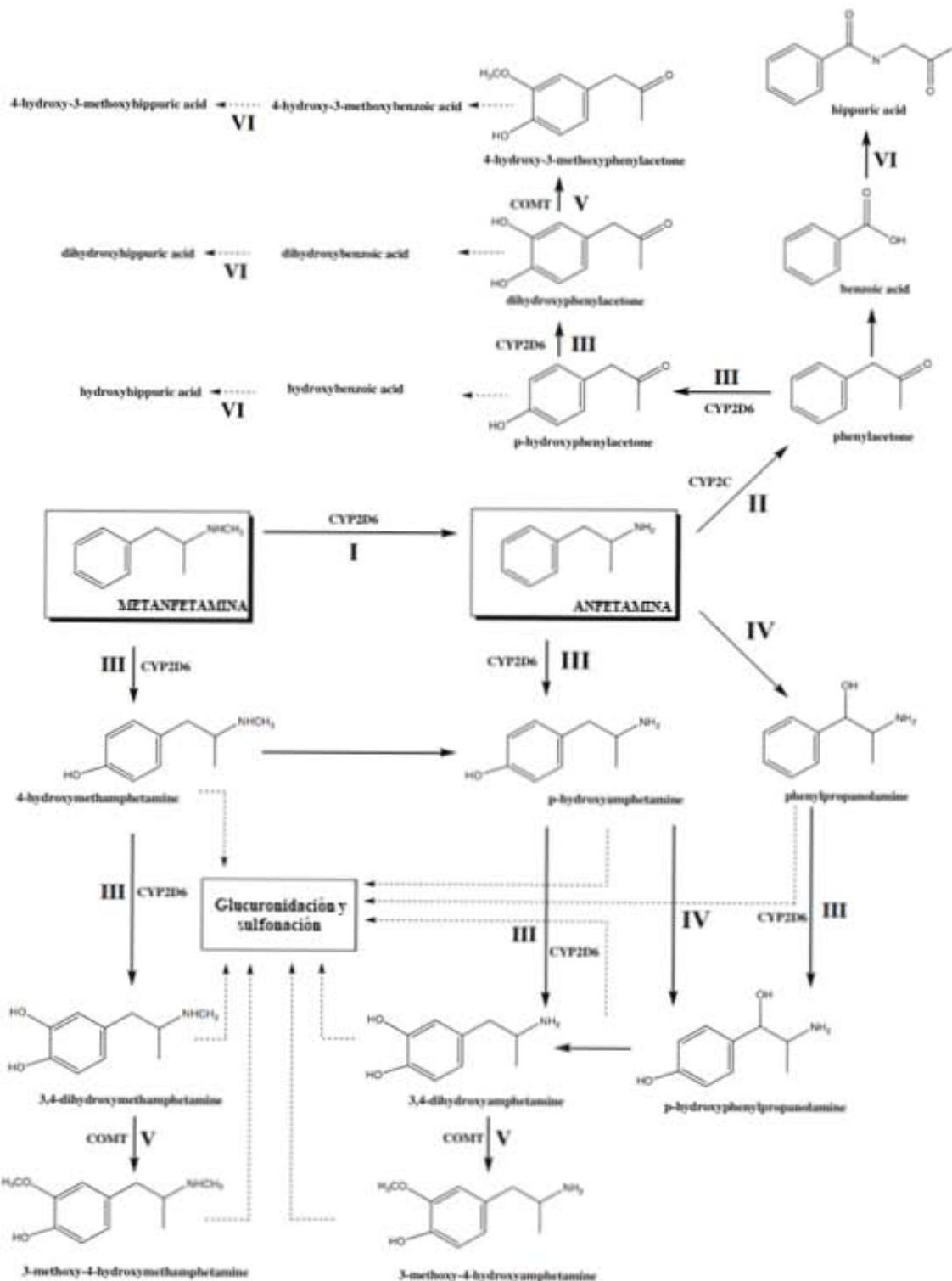


Figura 3. Vías metabólicas de la Anfetamina y Metanfetamina en humanos. I N-desmetilación; II deaminación oxidativa; III hidroxilación aromática; IV hidroxilación alifática; V O-metilación; VI conjugación de glicina (Carvalho et al., 2012).

## EFFECTOS TÓXICOS DEL CONSUMO DE COMPUESTOS ANFETAMÍNICOS

La toxicidad de los compuestos anfetamínicos generalmente ocurre en el uso recreativo. La dosis letal media oral en ratas, para la dextroanfetamina es 96.8 mg/kg. Mientras que, en humanos la muerte por anfetamina se ha registrado desde una dosis de 1.5 mg/kg (Fitzgerald & Bronstein, 2013). Los compuestos anfetamínicos cruzan la barrera hematoencefálica rápidamente después de la ingestión o la inyección debido a ello aumentan la actividad de los neurotransmisores dopamina y norepinefrina. Sin embargo, también inducen la liberación de epinefrina, serotonina e histamina. La serotonina elevada puede afectar el hipotálamo y, por lo tanto, causar hipertermia. El aumento de los niveles de dopamina en el sistema nervioso central (SNC) causa psicosis, efectos eufóricos y otros trastornos del movimiento. Los compuestos anfetamínicos también pueden causar convulsiones debido a la muerte neuronal por la interacción entre éstos y los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA). Los niveles de catecolamina también son elevados en la sobredosis de los compuestos anfetamínicos, lo que causa un aumento de la energía y un aumento de la estimulación con una disminución del letargo. La taquicardia y otras arritmias se deben a los efectos simpaticomiméticos y pueden causar un flujo sanguíneo cerebral significativo que aumenta en un 30%. Esto se observa particularmente en la corteza frontal izquierda que puede provocar hemorragias y otras formas de derrames cerebrales. Varios estudios concluyen que el abuso de los compuestos anfetamínicos está fuertemente asociado con la enfermedad arterial coronaria y con hemorragias subaracnoideas. Su uso a largo plazo se asocia con mionecrosis, miocardiopatía e infarto de miocardio (Darke et al., 2018; Vasan & Olango, 2018). Otros estudios en ratones reportan que el consumo de MDMA en bajas dosis provoca daño al DNA espermático, aumento en el estrés oxidativo y daño a DNA en neuronas del hipocampo (Barenys et al., 2009; Frenzilli et al., 2007) y en ratas hembras el aumento de estrés oxidativo y daño a DNA en neuronas del cuerpo estriado y núcleo accumbens al ser administradas con metanfetamina (Johnson et al., 2015) Es importante señalar que además de la neurotoxicidad, el consumo de compuestos anfetamínicos afectan también de gravedad al hígado, corazón y riñones (Carvalho et al., 2012) además de ser generadores de estrés oxidativo y ser un factor de riesgo de enfermedades como la hipertensión pulmonar arterial (Chen et al., 2017).

## EL PAPEL DE LA FARMACOGENÓMICA EN EL METABOLISMO

La Farmacogenómica implica el estudio del papel de la herencia en la variación individual en la respuesta al fármaco. Esta disciplina evolucionó a partir de la convergencia de avances en Farmacología Molecular y Genómica (Weinshilboum & Wang, 2006).

Las mutaciones genéticas se pueden producir como cambios estructurales, incluyendo la sustitución de nucleótidos, la delección completa de genes, la duplicación de genes y la translocación genética. La forma más común de mutaciones genéticas es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el que la secuencia de nucleótidos en una posición específica se cambia por sustitución, translocación, inserción o delección (Linder & Valdes, n.d.). Cada uno de estos cambios en la estructura génica introduce una forma variante del gen en el grupo genético de población.

Los diversos tipos de polimorfismo genético se clasifican generalmente por su influencia en la expresión de proteínas (por ejemplo, enzima metabolizadora, proteínas de transporte o receptor de fármaco) o fenotipo final. El polimorfismo genético que resulta en la delección de genes conduce invariablemente a la pérdida de la función y a la ausencia de producción del producto génico. Por el contrario, la duplicación de genes y multiduplicación más comúnmente conduce a una mayor expresión del producto génico y un fenotipo de hiperactividad (Weinshilboum & Wang, 2006). Una excepción a esto es la duplicación de un alelo que incluye la variación estructural adicional que conduce a la pérdida de función. La translocación genética típicamente produce un gen no funcional. SNPs pueden dar lugar a diversos cambios en la función de la proteína expresada dependiendo de donde el polimorfismo se produce en la estructura genética global. Los SNPs en el dominio regulador pueden influir en la regulación génica. En los exones codificantes sólo influyen en la función si hay un cambio de aminoácido resultante que altera la función proteica. Dentro de las regiones del intrón son típicamente silenciosos a menos que el SNP altere un nucleótido crítico para un empalme del RNA durante la maduración, que conduce típicamente a la pérdida o a la disminución en la función de la proteína. Un ejemplo importante es la enzima CYP2D6, conocida por participar en el metabolismo de 20% a 30% de los medicamentos utilizados en la clínica (Valdes & Yin, 2016).

#### CARACTERÍSTICAS DE LA SUPERFAMILIA DE ENZIMAS CITOCROMO P450

La eliminación de fármacos está en gran medida determinada por la acción de los citocromos P450 (CYP). De los 200 fármacos más utilizados clínicamente, el 73% requiere metabolismo y el 72% de las enzimas responsables son miembros de la superfamilia P450, predominantemente CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 y CYP1A2 (Wienkers & Heath, 2005). Los CYPs forman una superfamilia de hemoproteínas que catalizan una enorme diversidad de reacciones enzimáticas que tienen como sustratos tanto compuestos exógenos como endógenos. Los CYP de las familias 1 a 3 están principalmente implicados en el metabolismo xenobiótico, mientras que las otras familias están implicadas en el metabolismo de compuestos endógenos como la vitamina D, el ácido retinoico, el colesterol y las hormonas

esteroideas. Las enzimas CYP son metabolizadoras de los xenobióticos y son polimórficas debido a cambios funcionales de un solo nucleótido (SNP), inserciones/delecciones (indels) y variaciones del número de copias (CNV). Estas variaciones genéticas persisten en las poblaciones, principalmente porque no influyen en gran medida en las funciones endógenas. El principal fenotipo consiste en un metabolismo alterado del fármaco que puede mostrar importantes diferencias interétnicas, algunas de ellas causadas por deriva genética simple, pero otras probablemente relacionadas con la selección dietética/ambiental (Ingelman-Sundberg, 2005). La variabilidad interindividual en la catálisis dependiente del CYP es pronunciada y se traduce en cuatro fenotipos principales: ME, metabolizadores extensos que tienen actividad normal; PM, metabolizadores lentos que carecen de actividad enzimática; IM, metabolizadores intermedios que tienen un alelo funcional; y UM, metabolizadores ultrarápidos que normalmente tienen más de dos genes que codifican enzimas activas (Ingelman-Sundberg, 2004). Estas actividades variables influyen en el resultado clínico del tratamiento farmacológico, por lo que las reacciones adversas a los fármacos y la falta de respuesta a menudo pueden estar relacionadas con la alteración de la genética del citocromo P450 (Ingelman-Sundberg, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007; Meyer, 2004). Los polimorfismos genéticos clínicamente más importantes son CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6, que son responsables de aproximadamente el 40% del metabolismo de fármacos dependientes de la fase I. El polimorfismo genético del CYP también causa diferencias interindividuales en la activación e inactivación de agentes anticancerígenos y carcinógenos (Rodriguez-Antona et al., 2010).

#### *La enzima CYP2D6*

En humanos, el mejor ejemplo estudiado de polimorfismo genético en el metabolismo de fármacos de fase I es el polimorfismo de la 4-hidroxilasa de debrisoquina, o citocromo P450 2D6 (CYP2D6) (Ingelman-Sundberg, 2005). Esta enzima cataliza el metabolismo oxidativo de aproximadamente el 25% de los fármacos clínicamente importantes, incluyendo muchos antidepresivos, antipsicóticos, bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, antihipertensivos, antiarrítmicos, opioides, analgésicos, antieméticos, y agentes quimioterapéuticos/de reemplazo hormonal (Zhou, 2009).

CYP2D6, el gen que codifica esta importante enzima metabolizadora de fármacos, se localiza en el cromosoma humano 22q13.1 y normalmente consiste en el gen activo y dos pseudogenes. Es uno de los citocromos más polimórficos; actualmente, la Base de Datos de Nomenclatura de Alelo del Citocromo P450 (CYP) ha descrito más de 100 alelos y subalelos (<http://www.cypalleles.ki.se/>). Las variaciones genéticas en el locus del gen CYP2D6 pueden potenciar o disminuir la actividad enzimática de CYP2D6. La mayoría de las variaciones genéticas que están

asociadas con la actividad metabólica CYP2D6 alterada son variaciones de un solo nucleótido, como polimorfismos de nucleótido único (SNP) e inserciones o deleciones de nucleótidos. El gen CYP2D6 también es conocido por sus variaciones en el número de copias del gen estructural, incluidas grandes eliminaciones, duplicaciones y multiplicaciones (Gaedigk, 2013).

Debido a la naturaleza altamente polimórfica de CYP2D6, existe una amplia gama de actividad catalítica entre los individuos, y estas diferencias en la actividad de CYP2D6 han demostrado ser un importante contribuyente a la respuesta interindividual de los medicamentos y drogas (Hicks et al., 2014a). Los alelos funcionales incluyen al CYP2D6\*1 (“wild type”) y al CYP2D6\*2, el alelo más común que codifica actividad enzimática ligeramente reducida (~80% del “wild type”) (Tabla 3). Las diferencias en el número y tipo de variantes alélicas, así como el número de copias del gen producen cuatro fenotipos metabólicos predichos por CYP2D6: metabolizador ultra rápido (MU), metabolizador extensivo (ME), metabolizador intermedio (MI) y metabolizador lento (MP) (Ravyn et al., 2013; Teh & Bertilsson, 2012).

Los individuos con fenotipo de metabolizador ultra rápido tienen duplicación del gen CYP2D6 en ausencia de alelos inactivos. Los individuos con fenotipo de metabolizador extenso tienen dos alelos funcionales de CYP2D6 de tipo “wild type”. Los individuos con fenotipo de metabolizador intermedio tienen dos alelos de actividad disminuida o un alelo de actividad disminuida y un alelo inactivo o un alelo activo y un alelo inactivo. Los individuos con fenotipo de metabolizador lento tienen dos alelos inactivos (Dodsworth et al., 2018). En general, mientras que el fenotipo ME consiste en la mayoría de la población general (72-88%), las apariciones de fenotipos de MP y MU son menos comunes en aproximadamente 1-20 y 1-10%, respectivamente (Dean, 2012), y varían significativamente según etnicidad. En las poblaciones caucásicas los alelos no funcionales más comunes son CYP2D6\*4, CYP2D6\*5 y CYP2D6\*3 a una frecuencia de 20%, 2-7% y 1-2%, respectivamente; pero estos alelos son raros entre la mayoría de las poblaciones asiáticas y de África. El porcentaje de sujetos con genes duplicados/multiduplicados (CYP2D6\*XN) es de 1-2% en Suecia, 3,6% en Alemania, 7-10% en España y 10% en Sicilia. El fenotipo PM se encuentra en el 7% de los caucásicos pero solo el 1% de los asiáticos, mientras que el fenotipo UM se encuentra en el 2% de los caucásicos y hasta el 25% de algunos grupos étnicos de Etiopía (Bertilsson et al., 1992; Bradford, 2002; Johansson et al., 1993, 1994; Kagimoto et al., 1990; Masimirembwa et al., 1996; Nakamura et al., 2002)

López y colaboradores (López et al., 2005) realizaron una genotipificación de seis variantes comunes de CYP2D6 y alelos de CYP2D6\*x2 en 243 voluntarios mestizos mexicanos. Encontrando que las frecuencias alélicas de CYP2D6\*2, \*3, \*4, \*5, \*10

y \*17 fueron de 19.34, 1.44, 11.21, 2.67, 12.45 y 1.65%, respectivamente, mientras que los alelos CYP2D6 duplicados se observaron en el 12.76% de los individuos.

Tabla 3: Principales polimorfismos de CYP2D6, posición en el gen y efecto en la proteína.

Exón	Posición en el DNA	Mutación	AA	Nombre sistemático	*1/WT	*2	*3	*4	*5	*6	*7	*8	*9	*10	*11	*12
1	31	G*A	11	V*M		A										
1	100	C*T	34	P*S				A						A		
1	124	C*A	42	G*R												F
2	883	G*C		Defecto de splicing												
2	974	C*A	91	L*M				A								
2	984	A*G	94	H*R				A								
2	997	C*G		Silenciosa				S								
2	1023	C*T	107	T*I												
2	1039	G*T		Silenciosa				S						S		
3	1661	G*C		Silenciosa		S								S	S	S
3	1707	DEL T		Marco de Lectura						F						
3	1758	G*T		Codón de paro								F				
4	1846	G*A		Defecto de splicing				F								
4	1976	G*A	212	G*E						A						
5	2549	DEL A		Marco de Lectura										A		
5	2623-15	DEL	281	L 28 Borrado												
6	2850	C*T	296	R*C		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: Cambio de aminoácido. S: Mutación silenciosa. F: Cambio en actividad. Tomada y modificada de Miranda, 2008.

## DAÑO EN EL DNA POR AGENTES QUÍMICOS

El cuerpo humano adulto consiste en  $10^{14}$  células que surgieron de un único cigoto a través de la división celular. Durante las divisiones cada célula tiene la capacidad de adquirir mutaciones tanto de procesos endógenos como ambientales. En una célula se puede encontrar más de 70,000 lesiones en el DNA por día. Dichas lesiones pueden ser debidas a la desaminación de citosina espontánea, daño oxidativo endógeno o debido a agentes exógenos ambientales que dañan el DNA. Si estas lesiones no se reparan o se reparan erróneamente, pueden dar como resultado alteraciones en el DNA, tales como sustituciones de nucleótidos de DNA, inserciones y deleciones pequeñas o grandes, variaciones de número de copias y reordenamientos cromosómicos complejos (Saini & Gordenin, 2018).

La Genética Toxicológica es una rama de la Toxicología que identifica y analiza la acción de agentes con toxicidad directa en los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Aunque algunas sustancias dañan al DNA a concentraciones que también producen una toxicidad aguda y muerte, el objetivo primordial de la Genética Toxicológica es detectar y analizar el daño potencial de aquellos agentes que tienen interacciones altamente específicas con los ácidos nucleicos y que producen alteraciones genéticas a concentraciones subtóxicas (Brusick, 2013). El daño en el DNA que ocurre de forma continua en todos los organismos desempeña un papel central en muchos procesos patológicos (Basu, 2018). Un agente



genotóxico es aquel que induce mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, amplificaciones de genes, reordenamientos cromosómicos o cambios cromosómicos numéricos (aneuploidía). Por lo tanto, las pruebas genotóxicas están diseñadas para detectar uno o más tipos de alteraciones genéticas (Alberts et al., 2014).

#### ENSAYO DE MICRONÚCLEOS PARA EVALUAR LA GENOTOXICIDAD

El ensayo de aberraciones cromosómicas es la técnica citogenética clásica, que permite directamente observar y contar las aberraciones en los cromosomas en la metafase. Sin embargo, la complejidad y el tiempo para analizar las aberraciones y el efecto de confusión de la pérdida de cromosomas de las preparaciones en metafase, ha estimulado el desarrollo de un sistema más simple para medir el daño cromosómico. El ensayo de micronúcleos (MN) ha surgido como uno de los métodos preferidos para evaluar el daño cromosómico porque permiten medir la pérdida cromosómica y la rotura cromosómica de manera confiable (Fenech, 2006). Los MN son pequeños cuerpos extranucleares que se forman en mitosis a partir de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas que se quedan rezagados en la anafase y no se integran en los núcleos de la célula hija. Se ha propuesto que los micronúcleos que contienen fragmentos cromosómicos pueden resultar del rompimiento directo del DNA, la replicación de un genotipo dañado y/o la inhibición de la síntesis de DNA. Los MN que contienen cromosomas enteros se pueden formar principalmente por fallo del huso mitótico, cinetocoro u otras partes del aparato mitótico o por daño a las subestructuras cromosómicas, alteraciones en la fisiología celular o interrupción mecánica. Por lo tanto, una mayor frecuencia de células micronucleadas puede ser un biomarcador de efectos genotóxicos que reflejan la exposición a agentes que rompen cromosomas (clastogénicos); o a agentes que cambian el número de cromosomas (aneugénico) (Fenech & Bonassi, 2011).

Debido a que los micronúcleos solo se pueden expresar en células que completan la división nuclear, se desarrolló un método que identifica dichas células por su aspecto binucleado cuando se bloquea la citocinesis mediante citocalasina B (Cyt-B). La Cyt-B es un inhibidor de la polimerización de actina requerido para la formación del anillo miofilamento que constriñe el citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis (Haaf et al., 1999). El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) permite una mejor precisión porque los datos obtenidos no se confunden por la cinética de división celular alterada causada por la citotoxicidad de los agentes evaluados o las condiciones de cultivo celular subóptimas (Fenech, 2000).

El ensayo de CBMN se desarrolló originalmente como un sistema para medir micronúcleos (MN); sin embargo, también se puede usar para medir puentes

nucleoplásmicos (PN), gemaciones nucleares (BUD), muerte celular (necrosis o apoptosis) y tasa de división nuclear. Se sugiere que los puentes nucleoplásmicos proceden de cromosomas dicéntricos en los que los centrómeros jalan hacia los polos opuestos de la célula en anafase y son indicativos de una reparación errónea del DNA, reordenamiento cromosómico o fusiones terminales de los telómeros, pueden romperse para formar MN. El proceso de gemación nuclear es el mecanismo por el cual las células eliminan DNA amplificado y/o exceso y es por lo tanto un marcador de amplificación génica y/o alteración de la dosificación génica. De manera integral, el ensayo de CBMN mide todas las células, incluidas las células necróticas y apoptóticas, así como el número de núcleos por célula para proporcionar una medida de citotoxicidad y actividad mitótica (Fenech et al., 2011). El ensayo de CBMN se ha convertido en un "citómetro" para medir el fenotipo de inestabilidad cromosómica y la viabilidad celular alterada por defectos genéticos y/o deficiencias nutricionales y/o genotoxinas exógenas (Fenech, 2006).

#### EL PROCESO DE MUERTE CELULAR EN LA ELIMINACIÓN DEL DAÑO

El daño en el DNA interfiere con el ciclo celular y, por lo tanto, existen proteínas de punto de control que retrasan la progresión del ciclo celular proporcionando el tiempo necesario para la reparación del DNA. Si el daño excede la capacidad de reparación, se activan las vías para desencadenar la muerte celular (Basu, 2018).

En términos generales a través de criterios morfológicos y bioquímicos, se han definido tres clases de muerte celular: la apoptosis, la autofagia y la necrosis. La apoptosis es una muerte celular regulada fisiológicamente, cuyos principales mediadores son proteasas denominadas caspasas; la autofagia media la degradación de organelos intracelulares alterados con formación de vesículas que se fusionan con vacuolas hidrolíticas. La necrosis se ha definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria; algunos patólogos la definen como los eventos ulteriores a la muerte celular (Agudelo & López, 2010). Las células que mueren como resultado de una lesión aguda generalmente se hinchan y estallan, liberando su contenido a las células vecinas, un proceso llamado necrosis celular, lo que provoca una respuesta inflamatoria potencialmente dañina. Por el contrario, la célula que sufre apoptosis muere sin dañar a las células vecinas; la célula se encoge y se condensa; el citoesqueleto colapsa, la envoltura nuclear se rompe y el DNA nuclear se fragmenta. La iniciación de la apoptosis está estrechamente regulada por mecanismos de activación, porque una vez que la apoptosis ha comenzado, inevitablemente conduce a la muerte de la célula. Los dos mecanismos de activación mejor entendidos son la vía intrínseca (también llamada vía mitocondrial) y la vía extrínseca (Alberts et al., 2014). La vía de señalización extrínseca es la encargada

del inicio de apoptosis, se encuentra involucrada en interacciones mediadas por receptores transmembrales como los receptores de muerte caracterizados por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína con dominios citoplásmicos de aproximadamente 80 aminoácidos, y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el “dominio de la muerte” que es el responsable de la apoptosis (González-Flores et al., 2014). La vía intrínseca de la apoptosis puede ser desencadenada por daño en el DNA, grandes aumentos en la concentración de calcio citosólico o estrés celular, así como un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. Esto activa la expresión del gen supresor de tumores p53, que a continuación, activa las proteínas pro-apoptóticas. PUMA y NOXA codifican para los dos miembros de la familia Bcl2 que permiten la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, Bax y Bak. La expresión de estas proteínas provoca la translocación de la membrana mitocondrial, resultando en la liberación de citocromo C y Apaf-1. Una vez que el citocromo C se une a Apaf-1 y procaspasa-9, se forma un apoptosoma. Este apoptosoma a continuación, activa la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 se activa, la mayor activación de otras caspasas, como las caspasas-3 y -7 permiten la digestión de los objetivos esenciales que afectan a la viabilidad celular (González et al., 2010).

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular. El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica (Agudelo & López, 2010). La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos (Toro, 2006).

Durante mucho tiempo, la necrosis se ha considerado como una forma accidental e incontrolada de muerte celular, pero existe evidencia de que la ejecución de la muerte celular necrótica puede estar finamente regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos. Por ejemplo, los receptores del dominio de la muerte (p. ej., TNFR1, Fas/CD95 y TRAIL-R) y los receptores Toll-like (por ejemplo, TLR3 y TLR4) han demostrado producir necrosis, en particular en presencia de inhibidores de caspasa. Algunos autores han propuesto el término "necroptosis" para indicar una necrosis regulada (en lugar de accidental). Los elementos causantes de la necrosis no están claros, sin embargo, se ha observado en alteraciones mitocondriales, por ejemplo, desacoplamiento, producción de especies reactivas de oxígeno, estrés nitroxidativo por óxido nítrico o compuestos similares y permeabilización de la membrana mitocondrial, cambios nucleares, degradación de los lípidos (después de la activación de fosfolipasas, lipoxigenasas

y esfingomielinasas), aumento en la concentración citosólica de calcio que provocan sobrecarga mitocondrial y activación de proteasas sin caspasa (calpaínas y catepsinas) (Kroemer et al., 2009).

La autofagia es un proceso de degradación celular que depende de los lisosomas y es usado por las células eucarióticas para degradar y reciclar o eliminar macromoléculas dañadas como proteínas, carbohidratos, lípidos y nucleótidos; orgánulos como mitocondrias, retículo endoplásmico, peroxisomas, así como materiales extraños. tales como virus y bacterias etc. Esto permite que la célula mantenga la homeostasis requerida para su supervivencia y también que las células respondan a condiciones de estrés que de otro modo podrían conducir a funciones celulares dañadas y la muerte celular posterior. Se han descrito tres tipos de autofagia: Autofagia mediada por chaperones, microautofagia y macroautofagia. La autofagia mediada por chaperones consiste principalmente en proteínas especializadas llamadas chaperonas que transportan a proteínas citosólicas mal plegadas a través de proteínas transmembrana específicas (LAMP2) a los lisosomas, la microautofagia involucra el envolvimiento directo del citosol por la membrana lisosomal y la macroautofagia, por otro lado, se refiere a la formación de orgánulos de doble membrana llamados autofagosomas que secuestran el citosol y lo envían a los lisosomas para su degradación (Offei, Yang, & Brand-Saberi, 2018).

#### LINFOCITOS COMO MODELO BIOLÓGICO

Resulta relevante mencionar las bondades del modelo de estudio, ya que el uso de linfocitos en la investigación de genotóxicos es conveniente debido a que los linfocitos proporcionan células humanas accesibles, que pueden obtenerse de pacientes y voluntarios, genotipificarse y/o fenotiparse. Siest y colaboradores midieron la expresión del RNAm de diferentes enzimas de CYP en linfocitos de 20 individuos sanos, demostrando la expresión de CYP2D6 en el linfocito humano (Siest et al., 2008).

#### ANTECEDENTES DIRECTOS

En 1983, Shimizu y colaboradores probaron el efecto mutagénico de la Nitrosometanfetamina por medio del ensayo de Ames en *S. typhimurium*, encontrando mutagenicidad en presencia de activación metabólica con microsomas hepáticos (S9) (Shimizu, et al., 1983). Sin embargo, Yoshioka y colaboradores (2007) evaluaron intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en células CHO-K1 expuestas *in vitro* a MDMA y no observaron cambios en presencia o ausencia de S9 (Yoshioka et al., 2007). En un modelo *in vivo* con ratones expuestos a MDMA, se encontró daño a DNA en células sanguíneas, de cerebro y de hígado, utilizando el ensayo de electroforesis unicelular (cometa) en los cuales fueron sacrificados una hora después de la administración

intraperitoneal del compuesto (Alvarenga et al., 2010). Witt y colaboradores (2008) en 47 niños diagnosticados con TDAH no encontraron diferencia en la frecuencia de micronúcleos, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, entre antes y después del tratamiento de 90 días de sales mixtas de anfetaminas. Li y colaboradores (2003) encontraron inducción de micronúcleos y de intercambios de cromátidas hermanas en células CHO-K1 tratadas con Metanfetamina y en un grupo de individuos consumidores de Metanfetamina, indicando que la genotoxicidad de este compuesto ocurre no sólo *in vitro* sino también en sujetos humanos, además, los efectos genotóxicos inducidos por Metanfetamina fueron dependientes de la dosis consumida. En los dos estudios con poblaciones humanas, la variabilidad individual fue, evidente por la dispersión de los datos (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios genotóxicos realizados con anfetaminas y drogas similares.

Compuesto	Biomarcador	Modelo	Observaciones	Referencia
Nitrosometanfetamina	Ensayo de Ames	<i>S. typhimurium</i>	Mutagenicidad en presencia de S9	Shimizu et al, 1983
MDMA	Intercambio de cromátidas hermanas. Aberraciones cromosómicas	Células de ovario de hámster chino	Sin cambios en presencia o ausencia de S9	Yoshioka et al, 2007
MDMA*	Ensayo cometa	Células de sangre, cerebro, e hígado de ratón.	Existencia de daño al DNA.	Alvarenga et al., 2010.
Sales mixtas de Anfetamina	Micronúcleos, Intercambio de cromátidas hermanas, Aberraciones cromosómicas.	Pacientes de 6 a 12 años de edad diagnosticados con TDAH.	No se observó daño citogenético después del tratamiento.	Witt et al., 2008.
Metanfetamina	Micronúcleos, Intercambio de cromátidas hermanas	Células CHO-K1.	Efectos genotóxicos sin presencia de S9	Li y colaboradores , 2003.
		Personas consumidoras.	Correlación positiva de daño al DNA con la dosis ingerida.	

\*MDMA: 4-metielendioxymetanfetamina

## **JUSTIFICACIÓN**

El uso de drogas ilegales ha registrado un aumento significativo. La mayoría de los estudios acerca de los efectos de los compuestos anfetamínicos se refieren a problemas de adicción y efectos sobre el SNC pero poco se conoce sobre los efectos genotóxicos (daño al DNA). Evaluar el daño al DNA es relevante debido a que éste se ha asociado con un aumento de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer.

El estudio en humanos presenta dificultades en cuanto a este tipo de drogas por las 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 de estudio son los leucocitos aislados de sangre periférica.

## **HIPÓTESIS**

Dado que los compuestos anfetamínicos son metabolizados por CYP2D6, la presencia de polimorfismos genéticos asociados a la actividad nula o reducida de CYP2D6, podrían influir en el daño al DNA producido por los compuestos anfetamínicos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que el daño en DNA inducido por D-Anfetamina y Metanfetamina depende del genotipo de CYP2D6.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar a los individuos con los genotipos asociados a la funcionalidad CYP2D6:
  - a. de actividad normal (\*1 y \*2)
  - b. de actividad baja (\*4, \*10 y \*17).
2. Evaluar el efecto citotóxico de D-Anfetamina y Metanfetamina en linfocitos de donadores con los genotipos de interés.
3. Determinar los cambios en los niveles de proteínas relacionadas con la respuesta al daño celular (Bcl2 y Bax) inducidos por D-Anfetamina y Metanfetamina en linfocitos de donadores con los genotipos de interés.
4. Determinar si la D-anfetamina y Metanfetamina inducen micronúcleos y parámetros asociados al daño celular (citoma) en linfocitos de donadores con los genotipos de interés.
5. Evaluar los niveles de H2AX fosforilada en linfocitos de donadores con los genotipos de interés, tratados con D-Anfetamina y Metanfetamina.
6. Determinar si los genotipos de CYP2D6 correlacionan con diferencias en la concentración de los compuestos parentales en los linfocitos.

## METODOLOGÍA

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se utilizó sangre periférica de individuos sanos con las siguientes características:

- Hombres y mujeres.
- Mayores de 18 años y menores de 40 años.
- Que no hayan consumido anfetaminas o alguna otra droga ilegal en los últimos 6 meses.
- Sin infecciones en los últimos 3 meses o sin alguna infección severa o enfermedad crónica como cáncer o hepatitis.
- Sin exposiciones recientes de rayos X o algún otro tipo de radiodiagnóstico.
- No fumadores.

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Por medio de punción venosa se extrajo sangre periférica de 35 individuos sanos de población abierta, usando tubos tipo Vacutainer® con EDTA para extracción de DNA. Una vez que se analizaron los polimorfismos de interés, se llevó a cabo la recolección de las muestras de sangre de 5 individuos controles (\*1, \*2) y 5 individuos con los polimorfismos \*3, \*4, \*10 y \*17, mediante tubos tipo Vacutainer® con Heparina sódica. Las muestras de sangre se procesaron para separar los leucocitos y realizar cultivos celulares.

### EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR

La extracción de DNA se realizó mediante el uso de protocolos convencionales. Brevemente, el botón de células blancas fue re-suspendido en una solución de TKM1 (Tris, KCl, MgCl<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>EDTA) y Nonidet P-40 (IGEPAL). Después de un ligero vórtex, los tubos fueron centrifugados y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente el botón nuclear fue re-suspendido con la solución TKM2 (Tris, KCl, MgCl<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>EDTA, NaCl), se agregó SDS al 10% y se incubó a 65 °C por 8 minutos. Se adicionó una solución de NaCl 6 M. Los tubos fueron centrifugados a 13 000 rpm por 10 minutos. En esta etapa se recuperó el sobrenadante y se desechó el botón de proteínas precipitadas. El DNA fue precipitado en etanol al 96% frío (-20 °C) y purificado en etanol al 70% mediante centrifugaciones a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Finalmente el DNA fue re-suspendido en Buffer TE (Tris/EDTA) y almacenado a -20 °C.

Las muestras de DNA fueron descongeladas a temperatura ambiente (TA), se tomaron 2 µL de la muestra para cuantificar en el equipo NANODROP®.



## DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE CYP2D6

La determinación de los polimorfismos de CYP2D6 \*2, \*3, \*4, \*10 y \*17 se realizó por PCR en Tiempo Real usando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Las reacciones se prepararon en placas con pozos (MicroAmp™) con 10 µL de TaqMan® Maxter mix, 0.5 µL de sonda TaqMan® de acuerdo a la variante alélica analizada, 4.5 µL de agua destilada y 5 µL de DNA (concentración 20 ng/µL), obteniendo un volumen total de 20 µL por reacción. Las placas se colocaron en el equipo de PCR (Applied Biosystems 7500) (Figura 4).

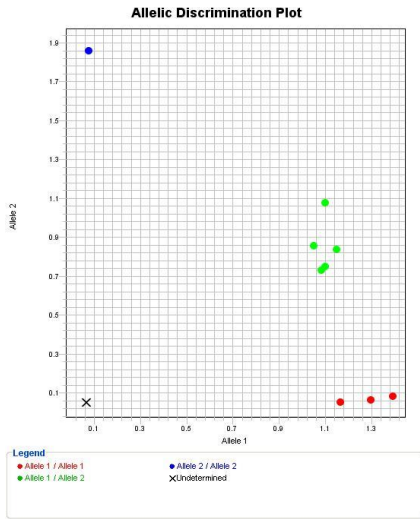
## OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE LINFOCITOS

El anillo de leucocitos fue recuperado mediante gradientes de densidad con Ficoll (Histopaque 9327) y centrifugación a 1500 rpm por 30 minutos. Posteriormente estas células fueron lavadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) y centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos eliminando el sobrenadante.

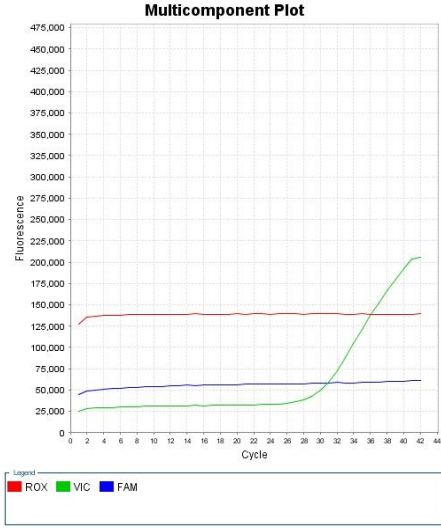
## TRATAMIENTO Y CULTIVOS DE LINFOCITOS

La Metanfetamina y la D-anfetamina fueron donadas por el Dr. Elías Miranda González (Grupo Diagnóstico Aries). Se obtuvieron de la casa comercial CERILLIANT la cual suministra los estándares con información documentada de su caracterización, lo que incluye el análisis por espectroscopía infrarroja, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía de líquidos de alta resolución.

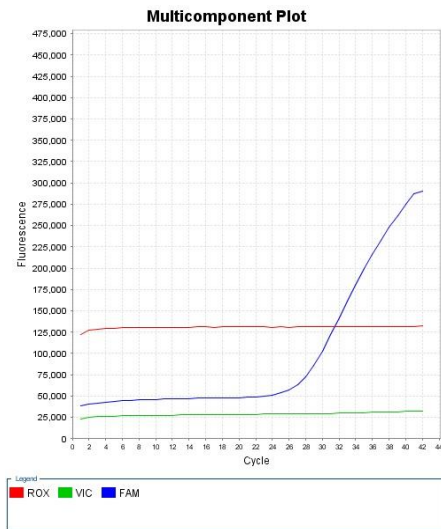
Se realizaron cultivos de linfocitos de los individuos seleccionados anteriormente. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células/mL en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino), aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco), L-glutamina 2 mM (Sigma) y fitohemaglutinina. Se trató *in vitro* con las concentraciones de 500, 1000 o 2500 ng/mL de D-Anfetamina o Metanfetamina, las cuales corresponden a dosis que pueden ser encontradas en consumidores (Miranda-G. et al., 2007). Estos cultivos de linfocitos se incubaron a 37° C durante 24 horas, tiempo en que se les aplicaron los tratamientos. Veinticuatro horas después (48 horas de cultivo) se les agregó 3 µL de Citocalasina B. Se dejaron incubando 24 horas más hasta completar las 72 horas de cultivo (48 horas con tratamiento). Como control positivo se trató con 2 µM de arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>). Se realizaron 2-3 cultivos independientes de cada donador.



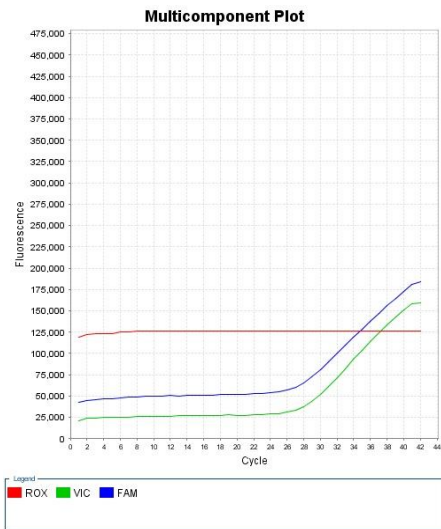
A



B



C



D

Figura 4. Gráfica representativa de la amplificación con PCR en tiempo real usando la sonda Taqman C\_\_27102414 que reconoce 4180G>C presente en los polimorfismos \*10\*2\*4\*17. A) Plot de discriminación alélica. Se observa resultados de muestras 9-15 con sus respectivos controles. B) Curva de amplificación de control "wild type" (WT) \*1/\*1. C) Curva de amplificación de control con mutación \*4/\*4. D) Curva de amplificación del individuo 11 con genotipo \*1/\*4.

## ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y PARÁMETROS DEL CITOMA POR BLOQUEO DE CITOCINESIS

Al término de las 48 horas de tratamiento, se realizó la cosecha de los linfocitos, los cuales fueron re-suspendidos, fijados y lavados con una solución de Metanol-Ácido Acético 3:1 (solución fijadora). Una porción de las células fijadas se colocó en un portaobjetos, el cual se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó con los colorantes azul de metileno y eosina (tinción de Wright).

La frecuencia de micronúcleos, al igual que el análisis del citoma ("buds", apoptosis, necrosis y puentes nucleoplásmicos), se estimó en 1000 células binucleadas. Adicionalmente, en estas laminillas se evaluó el índice de división nuclear (IDN), contando las células mononucleadas (CMN), binucleadas (CBN) y polinucleadas (CPN) (Figura 5) en un total de 200 células usando la fórmula:

$$\frac{(CMN) + (CBN * 2) + (CPN * 3)}{200}$$

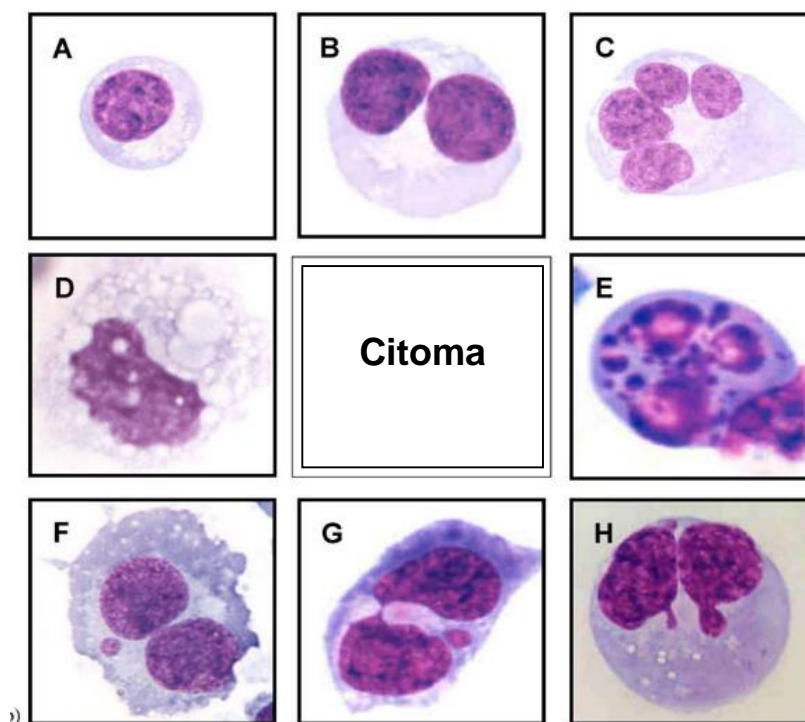


Figura 5. Fotomicrografías de las células puntuadas en el ensayo de "citoma" de CBMN. A, célula mononucleada; B, célula binucleada; C, célula multinucleada; D, célula necrótica; E, célula apoptótica; F, célula binucleada que contiene uno o más micronúcleos; G, binucleado que contiene un puente nucleoplásmico y un micronúcleo; H, gemaciones nucleares que contienen células binucleadas (Tomado de Fenech, 2006).

## EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

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 lisosomal y el segundo un marcador de la pérdida irreversible de la integridad de la envoltura nuclear. Los linfocitos se cultivaron siguiendo las mismas condiciones anteriormente detalladas. Se tomó una alícuota de 70  $\mu$ L, se centrifugó y resuspendió en 20  $\mu$ L de medio RPMI-1640 adicionándole 15  $\mu$ L de una solución fresca de FDA/EtBr, se mezcló y colocó una porción en un portaobjetos. Por lo menos 100 células fueron contadas por triplicado en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 de cada condición.

## NIVELES DE PROTEÍNAS GAMMA-H2AX, BCL2, BAX.

Se realizaron cultivos paralelos de linfocitos bajo las mismas condiciones para extracción de proteínas, las cuales se cuantificaron por espectrofotometría para su posterior análisis por Western blot para determinar la expresión de proteínas que se activan en respuesta al daño en DNA. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel al 12% de SDS poliacrilamida y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo específico para Bcl2, Bax y gamma-H2AX. Finalmente, los inmunoblots fueron revelados utilizando el sistema de peroxidasa-ECL-quimioluminiscencia (Amersham) en una placa radiográfica. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría óptica usando el programa Quantity One (BioRad).

## FOSFORILACIÓN DE H2AX ANALIZADO POR INMUNOFLUORESCENCIA

Con el objeto de obtener resultados más precisos sobre el mecanismo de daño genotóxico de los compuestos anfetamínicos se realizó un ensayo preliminar para medir los focos de  $\gamma$ H2AX por medio de inmunofluorescencia, en el que se expuso *in vitro* a linfocitos de un donador Metabolizador Extenso a 2500 ng/mL de Metanfetamina durante 1.5 horas posteriormente se les agregó el anticuerpo específico para  $\gamma$ H2AX seguido de un anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa Fluor 488. Se prepararon las laminillas con yoduro de propidio y se leyeron en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas con apoyo del Dr. Miguel Tapia.

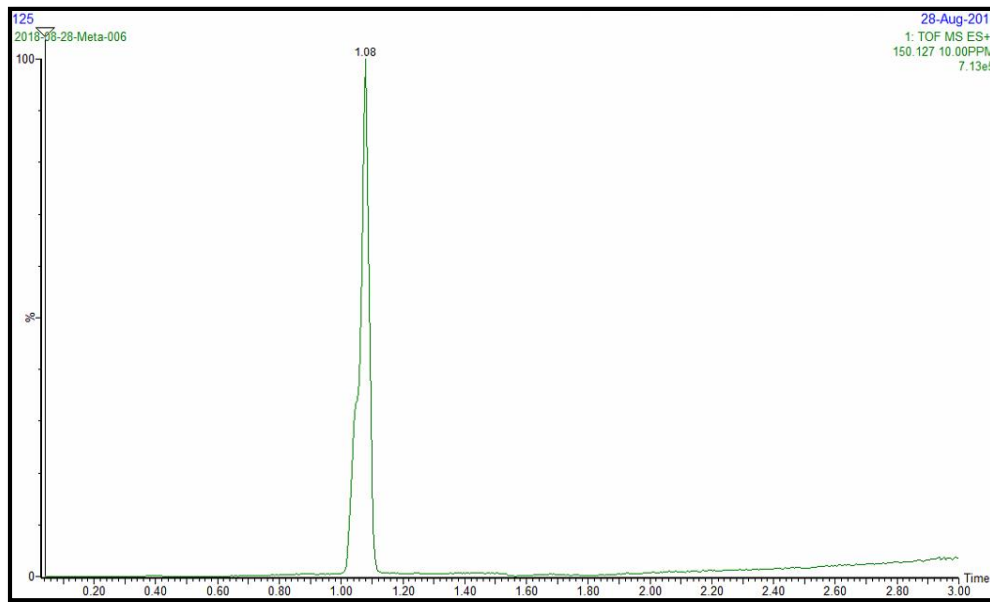
## DETERMINACIÓN DE D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).

Mediante la técnica de UPLC-MS, se cuantificó la Metanfetamina dentro y fuera de los linfocitos de dos donadores uno identificado como Metabolizador Extenso y el otro como Intermedio. Debido a que la concentración de 1000 ng/mL de Metanfetamina se encontró el mayor efecto genotóxico sin ser citotóxico (Figuras 5

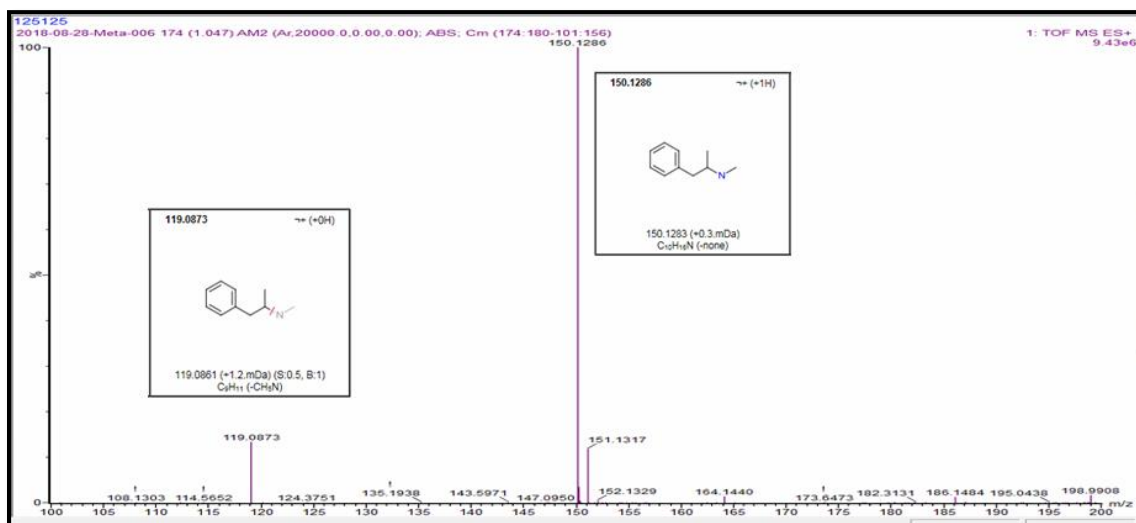
y 13) se decidió utilizar esta concentración para la realización de los ensayos por UPLC-MS en los dos tipos de donadores. Para lo anterior los linfocitos se cultivaron bajo las mismas condiciones establecidas en la metodología (Ver en Metodología sección de Obtención y separación de linfocitos y Tratamiento y cultivos de linfocitos), posteriormente las células se separaron del medio y se realizó la extracción de Metanfetamina con acetonitrilo al 100%. A su vez se preparó una serie de diluciones sucesivas de 1000 ng/mL hasta 0.9 ng/mL del estándar de Metanfetamina de la casa CERILLIANT con número de catálogo M-009 para realizar la curva estándar para la cuantificación de ésta.

La separación e identificación de la Metanfetamina por UPLC-MS se llevó a cabo en la Unidad de Metabolómica y Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en colaboración con la Dra. S. Ivonne Mora. La unidad cuenta con un equipo de ultracomatografía líquida de alta eficiencia Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución, Xevo G2 XS TOF (waters), con detector de tiempo de vuelo (TOF). Estos dos equipos se encuentran acoplados mediante una fuente de ionización electrospray (ESI). Se inyectaron 5 µl del analito en una columna Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 µm) y se optimizó el método de adquisición utilizando el estándar (Cerilliant M-009) a una concentración de 125 ng/mL. Se realizaron diversas inyecciones y protocolos de separación (gradiente e isocrático) y se determinó el óptimo protocolo de separación, en el cual se utilizó como fase acuosa 0.1% de ácido fórmico (FA) en agua (fase A) y como fase orgánica 0.1% de FA en acetonitrilo (fase B). El gradiente, cuyo flujo fue mantenido a 0.4 mL/min, inicia con 3 % de fase orgánica y, posterior a la inyección, se incrementa linealmente alcanzando el 90% al minuto 3, inmediatamente se volvió a la condición inicial en el minuto siguiente 1min y el sistema fue reequilibrado por dos minutos más, por lo tanto, la separación y la estabilización se lograron en 6.0 minuto La temperatura de la columna y del automuestreador se mantuvieron a 30 °C y 10 °C respectivamente.

Por otra parte, se ajustaron los parámetros del espectrómetro de masas para la identificación de la Metanfetamina mediante un análisis completo de las masas (full scan MS). En la figura 6 se muestra un cromatograma representativo de una inyección de 5 µl del estándar a una concentración de 125 ng/ml de Metanfetamina separada mediante el protocolo optimizado y registrada con los valores espectrométricos. Se muestra un tiempo de retención de 1.08 minutos, al extraer las masas del pico del cromatograma se observaron varias masas entre las que destaca la 150.1285 (Figura 7).



**Figura 6. Cromatograma representativo de Metanfetamina.** Se inyectó 5  $\mu$ l del estándar de Metanfetamina (CERILLIANT M-009) a una concentración de 125 ng/ml.



**Figura 7. Masas encontradas en el tiempo de retención de 1.08 minutos que corresponden al pico observado en el cromatograma de la figura 15.** El ion principal tiene una masa de masa 150.1283 y el ion secundario al perder el grupo amino tiene una masa de 119.086.

Una vez que se identificó la huella cromatográfica de la Metanfetamina bajo las condiciones de corrida establecidas, se procedió a procesar los medios dónde fueron cultivados los linfocitos de donadores MI y ME, así como el contenido intracelular de los mismos.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control con  $p < 0.05$  y para comparación entre grupos la prueba post hoc utilizada fue Sidak,  $p < 0.05$ . Los resultados se representaron como el promedio de cinco individuos con dos o tres experimentos independientes y error estándar de la media ( $X \pm E.E.$ ). Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6®.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS CON GENOTIPOS ASOCIADOS A UNA ACTIVIDAD BAJA Y NORMAL DE CYP2D6.

Se obtuvieron muestras de sangre de 35 individuos sanos, 30 de los cuales se extrajo el DNA en condiciones óptimas para ser genotipificados. Se realizó el análisis de los polimorfismos del gen CYP2D6 correspondientes a los asociados con normal y baja actividad. Encontrando una frecuencia del 66.6% de Metabolizadores Extensos y 33.3% de Metabolizadores Intermedios, como se observa en la Tabla 5. Para los estudios *in vitro* se eligieron 5 individuos Metabolizadores Extensos (ME, funcionalidad normal) y 5 individuos Metabolizadores Intermedios (MI, funcionalidad disminuida) de la enzima CYP2D6 formando dos grupos según su genotipo (Tabla 6).

Tabla 5. Frecuencia de genotipos y fenotipos encontrados en la población estudiada.

Genotipo de CYP2D6	Frecuencia (n=30)	%	Fenotipo	%
*1/*1	8	26.6	ME	66.6
*1/*2	11	36.6		
*2/*2	1	3.3		
*1/*4	8	26.6	MI	33.3
*2/*4	2	6.6		

Tabla 6. Formación de grupos por fenotipo.

ME		MI	
Individuo	Genotipo	Individuo	Genotipo
2	*1/*1	12	*1/*4
3	*1/*1	15	*1/*4
7	*1/*2	17	*2/*4
14	*1/*2	26	*1/*4
28	*1/*1	30	*2/*4

### CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA.

Se evaluó el efecto citotóxico de la D-Anfetamina y la Metanfetamina mediante la tinción con FDA/BrEt. En los leucocitos de los donadores MI, el tratamiento con los compuestos anfetamínicos afectó la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración ( $p < 0.05$ ). En contraste, en el grupo de ME sólo se observó esta diferencia en el cultivo tratado con la concentración más alta de Metanfetamina (2500 ng/mL) y con el control positivo de arsenito de sodio ( $As^{+3}$ ) (Figura 8).



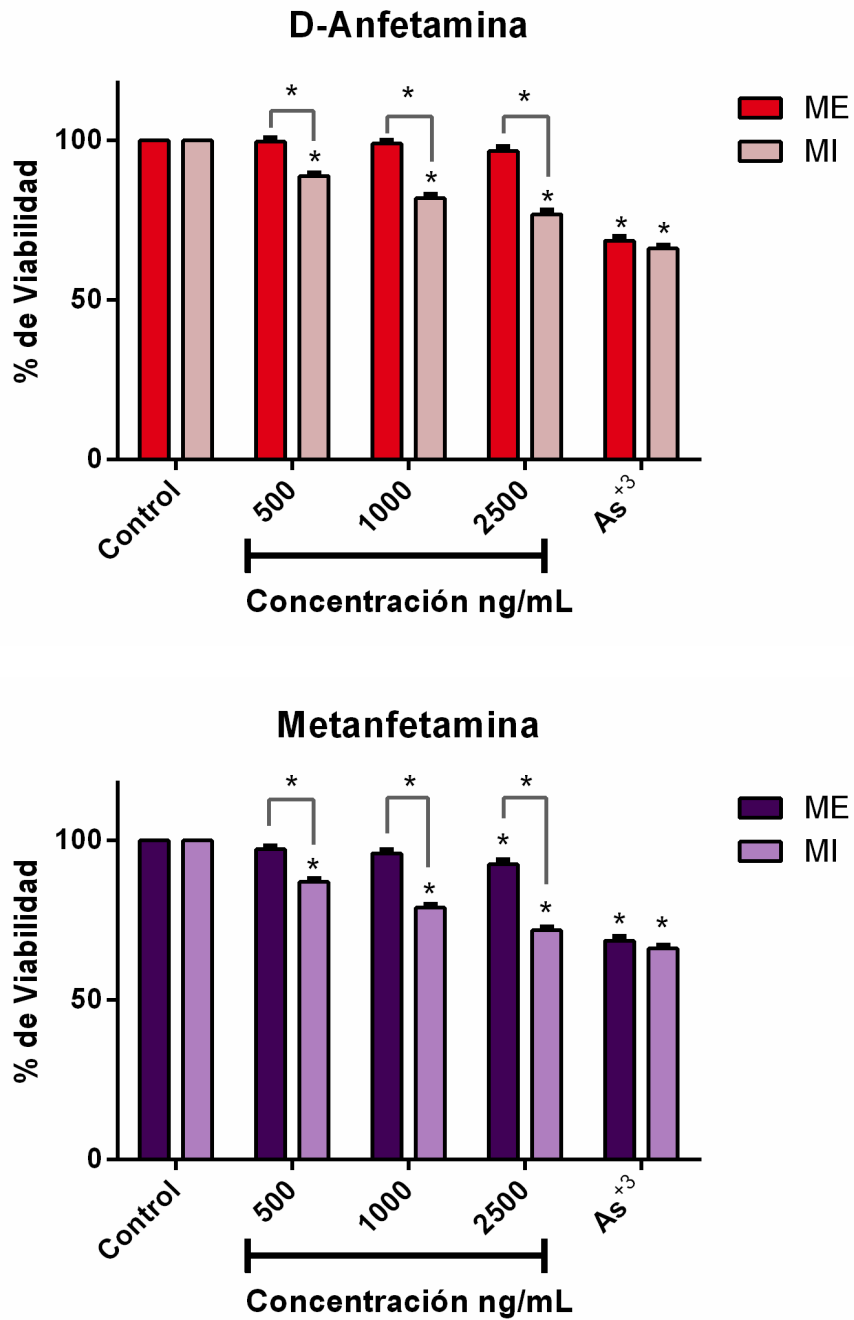


Figura 8. El efecto citotóxico inducido *in vitro* por D-Anfetamina y Metanfetamina está asociado al fenotipo de CYP2D6. Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=5 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=5 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos, \*  $p < 0.05$ .

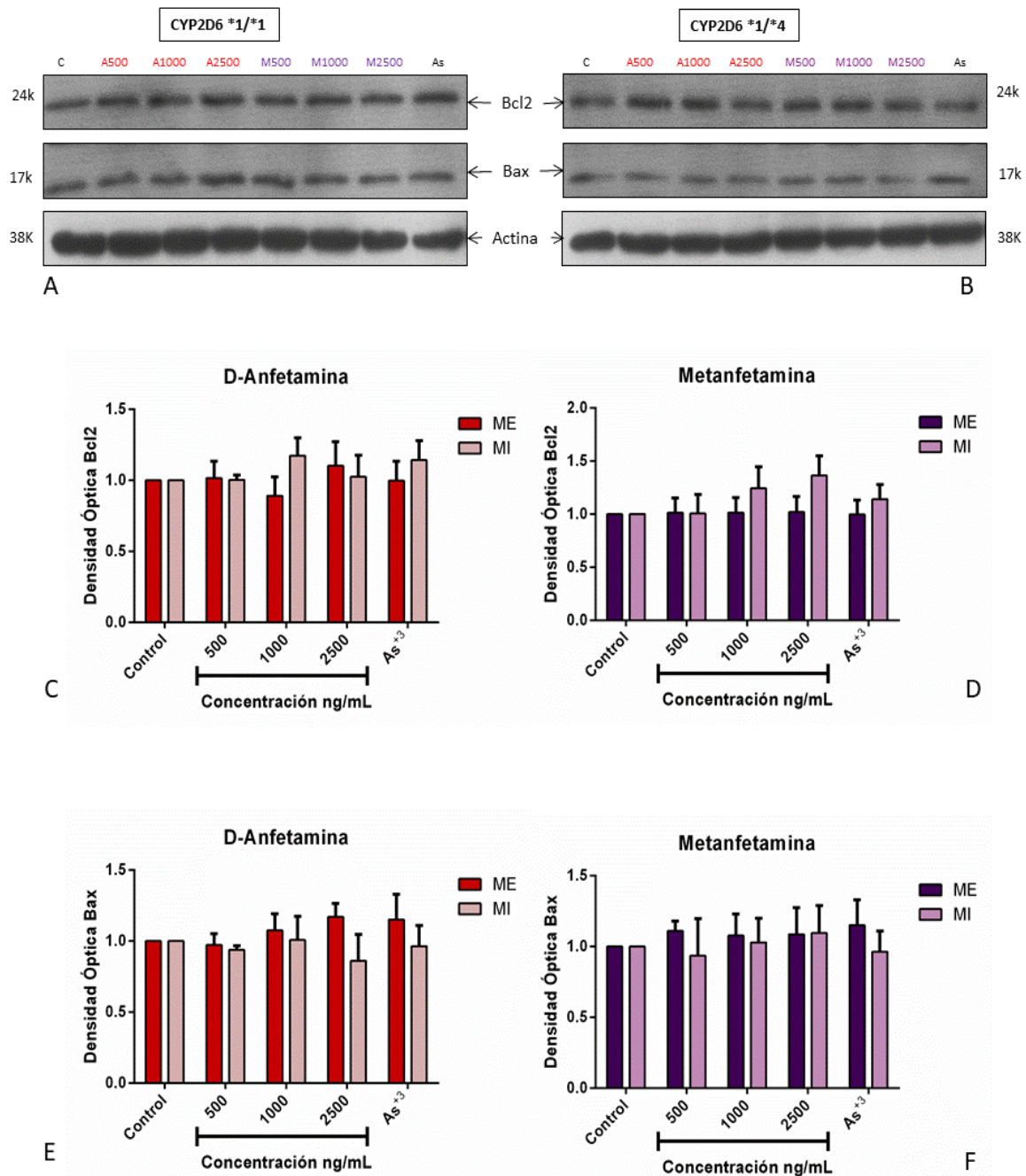
## EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PRO Y ANTIAPOPTÓTICAS (BCL<sub>2</sub> Y BAX)

Para conocer el mecanismo de muerte celular causado por los compuestos anfetamínicos se realizaron cultivos de linfocitos bajo las mismas condiciones para análisis de las proteínas Bcl2 y Bax; Bcl<sub>2</sub> que tiene participación antiapoptótica en el control del ciclo celular y Bax que es una proteína proapoptótica. No se observan diferencias significativas en la expresión de ninguna de las proteínas, bajo ninguno de los tratamientos (Figura 9).

El coeficiente Bax/Bcl<sub>2</sub> es una relación de la expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas Bax y Bcl<sub>2</sub> respectivamente (Kroemer et al., 2009); el cual cuando es mayor uno indica que existe en la célula un proceso de apoptosis, por otro lado si el valor es menor indica que no hay apoptosis. En la tabla 7 se muestra que en los linfocitos tanto de donadores ME como MI no hay proceso de apoptosis por la exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina.

Tabla 7 Determinación de la relación Bax/Bcl<sub>2</sub>

	D-Anfetamina		Metanfetamina	
	ME	MI	ME	MI
Control	1.000	1.000	1.000	1.000
500	0.90 ± 0.04	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.85 ± 0.08
1000	0.90 ± 0.04	0.87 ± 0.07	0.87 ± 0.05	0.94 ± 0.10
2500	0.87 ± 0.03	0.87 ± 0.07	0.89 ± 0.07	0.91 ± 0.09
As <sup>+3</sup>	0.95 ± 0.13	0.93 ± 0.10	0.95 ± 0.13	0.96 ± 0.08

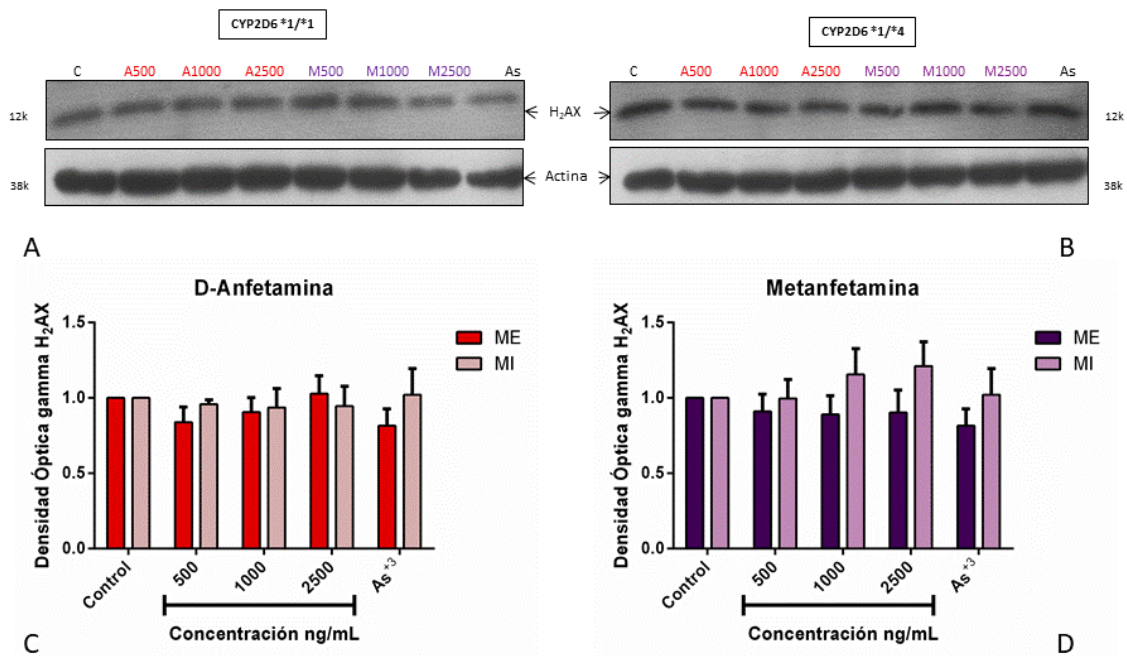


**Figura 9. La exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina no afecta la expresión de Bcl<sub>2</sub> y Bax.** A) Inmunoblots representativos de la expresión proteica de Bcl<sub>2</sub>, Bax y Actina de un individuo con genotipo para CYP2D6 \*1/\*1 (ME). B) Inmunoblots representativos de Bcl<sub>2</sub>, Bax y Actina de un individuo con genotipo para CYP2D6 \*1/\*4 (MI). Densidad óptica de las bandas inmunoreactivas la proteína Bcl<sub>2</sub> en leucocitos tratados con D-Anfetamina (C) y Metanfetamina (D). Densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de proteína Bax en leucocitos tratados con D-Anfetamina (E) y Metanfetamina (F). Las barras muestran la media y el error estándar (X±E.E.). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4

(n=3 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=3 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control.

### ACTIVACIÓN DE GAMMA H2AX COMO MARCADOR DE DAÑO A DNA

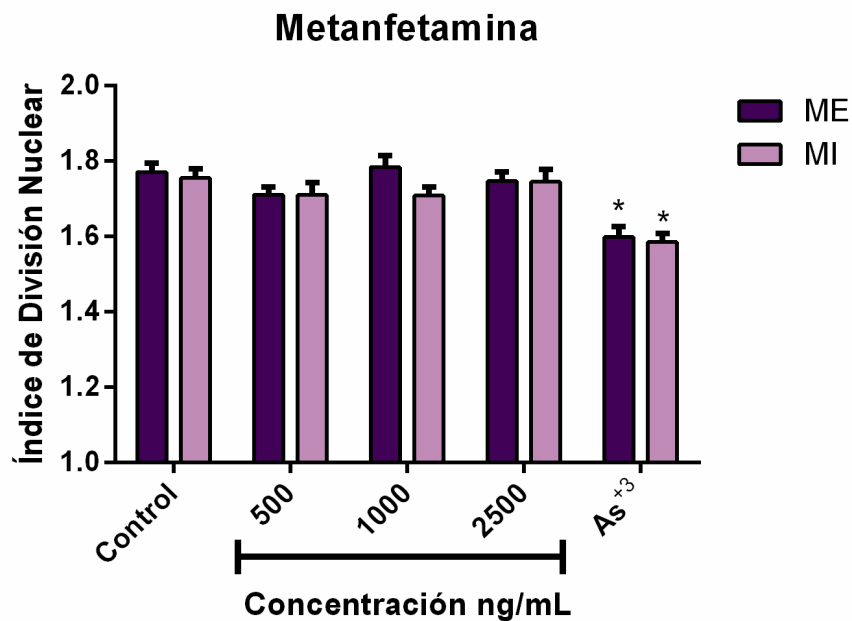
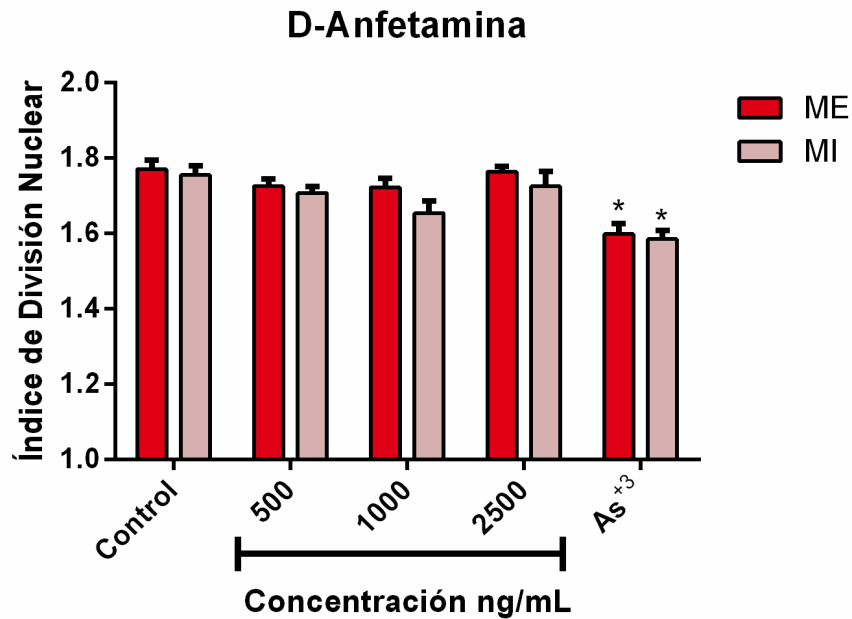
Se determinó la abundancia de la proteína gamma H2AX, la cual se fosforila cuando ocurre una ruptura de doble cadena en el DNA, por lo que ha sido utilizada como un marcador de daño. No se observaron cambios en la activación de la proteína con los tratamientos de D-Anfetamina y Metanfetamina con respecto al control. Al comparar entre los grupos de donadores ME y MI, la activación de gamma H2AX, tampoco mostró cambios estadísticamente significativos (Figura 10).



**Figura 10. La exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina no afecta la expresión de gamma-H2AX.** A) Inmunoblots representativos de la expresión proteica de gamma-H2AX y Actina de un individuo con genotipo para CYP2D6 \*1/\*1 (ME). B) Inmunoblots representativos de gamma-H2AX y Actina de un individuo con genotipo para CYP2D6 \*1/\*4 (MI). C) Densidad óptica de gamma-H2AX inducida por exposición *in vitro* de D-Anfetamina. D) Densidad óptica de la expresión de gamma-H2AX inducida por exposición *in vitro* de Metanfetamina. En C y D las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=3 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=3 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control.

### **EFFECTO CITOSTÁTICO INDUCIDO POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA.**

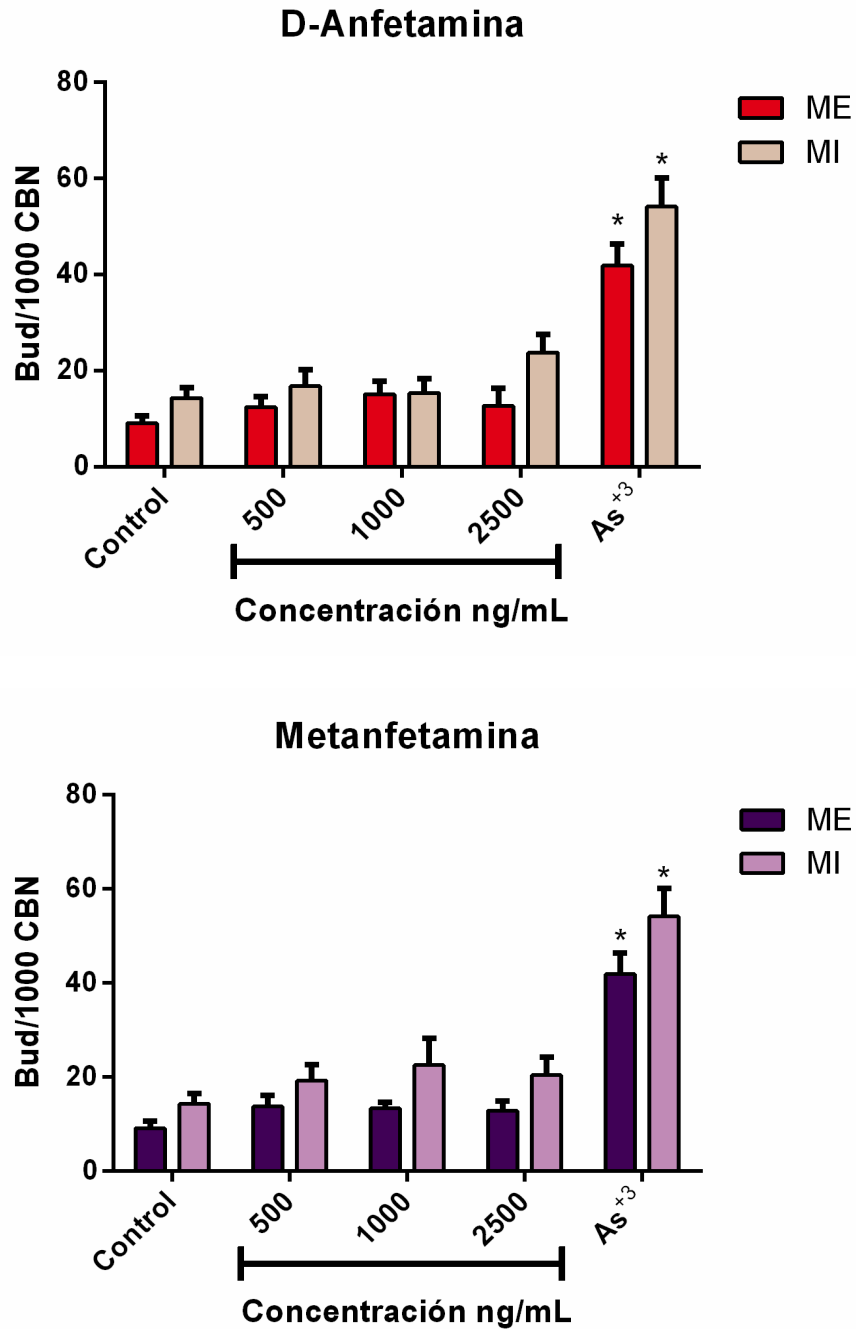
Con el objetivo de conocer si los compuestos anfetamínicos causan daño genotóxico, se realizó el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, dentro del cual se evaluó el índice de división nuclear (IDN) que es un parámetro que mide la proliferación celular. En la figura 11 se observa que la exposición a D-Anfetamina y a Metanfetamina no afecta de forma significativa la proliferación celular de los linfocitos.



**Figura 11.** La exposición *in vitro* a D-Anfetamina y Metanfetamina no afecta la proliferación celular medida por el Índice de División Nuclear (IDN). Las barras muestran la media y el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=5 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=5 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnett para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos.

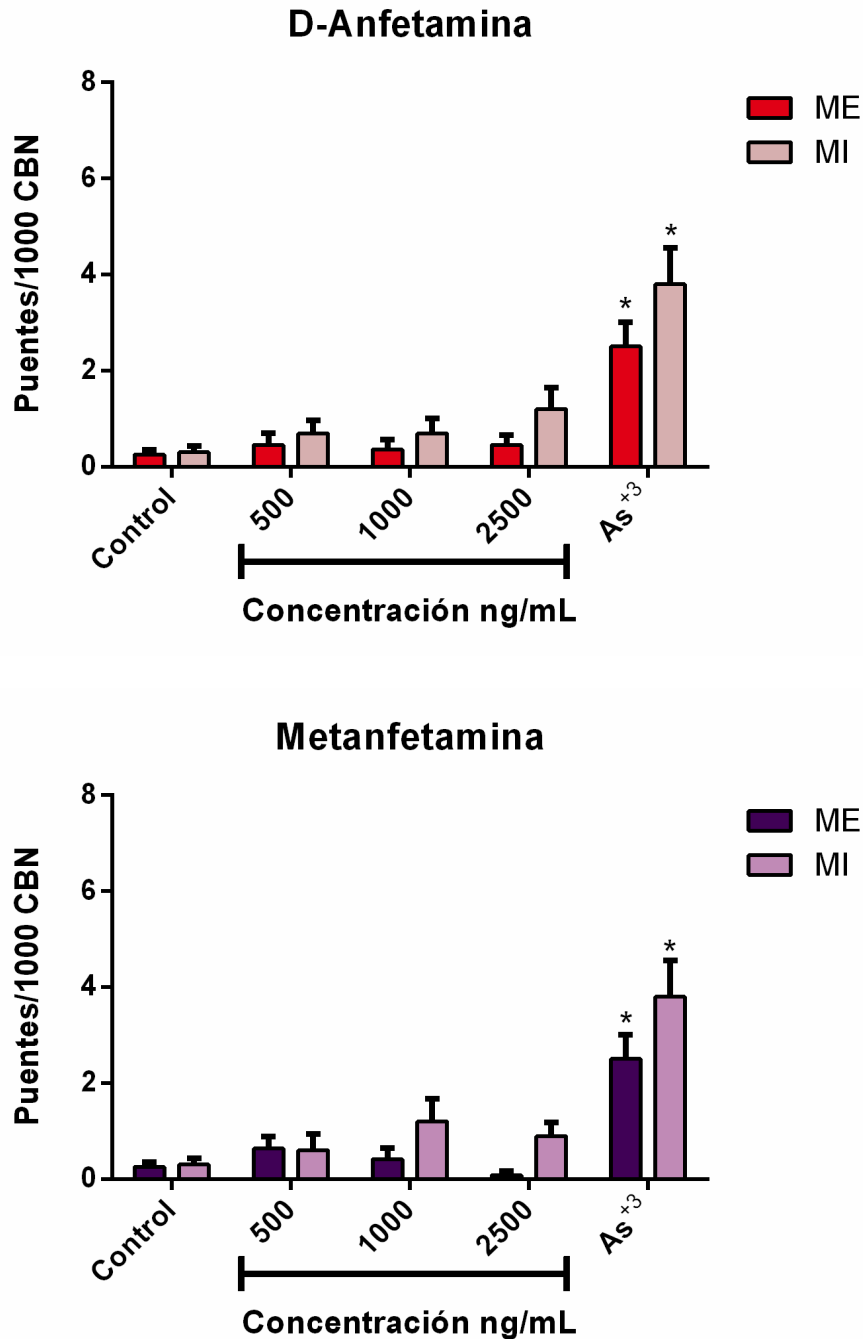
## **EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA SOBRE OTROS PARÁMETROS ASOCIADOS A DAÑO CELULAR (CITOMA).**

En el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos se pueden medir otros parámetros que han sido asociados a genotoxicidad y citotoxicidad. No se encontraron cambios significativos en la frecuencia de Buds y puentes nucleoplasmáticos cuando los linfocitos se trataron con las diferentes concentraciones de D-Anfetamina y Metanfetamina (Figuras 12 y 13).



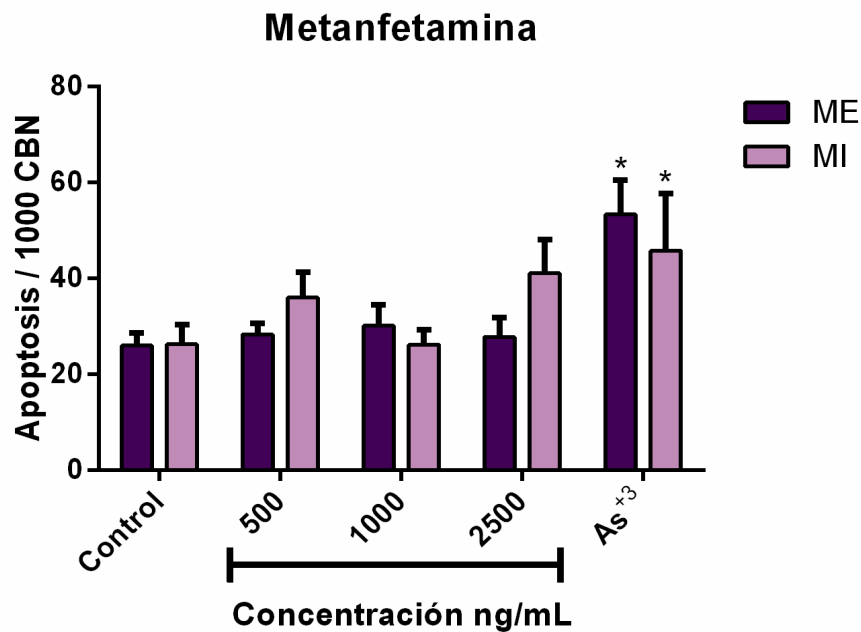
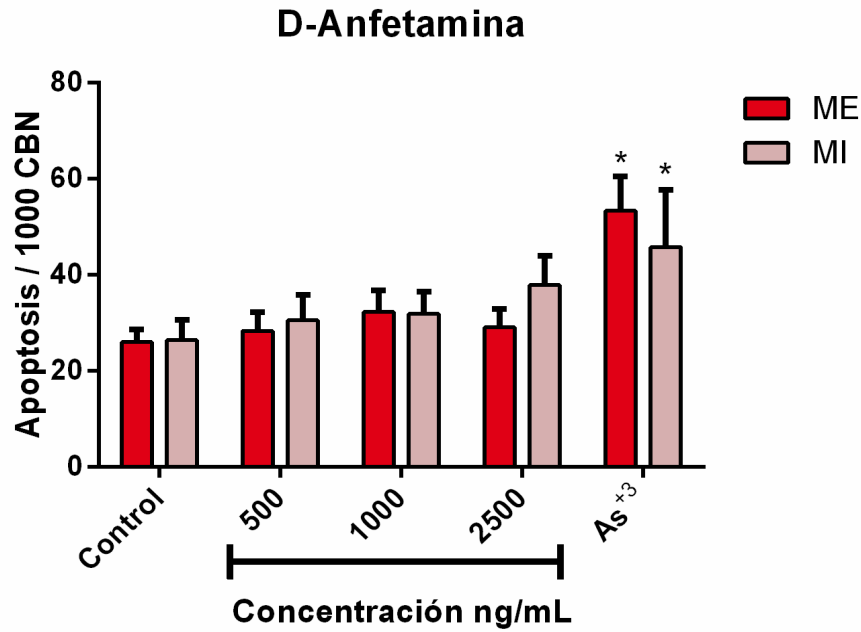
**Figura 12. La exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina no genera aumento en la frecuencia de buds por cada 1000 células binucleadas.** Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=5 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=5 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos.



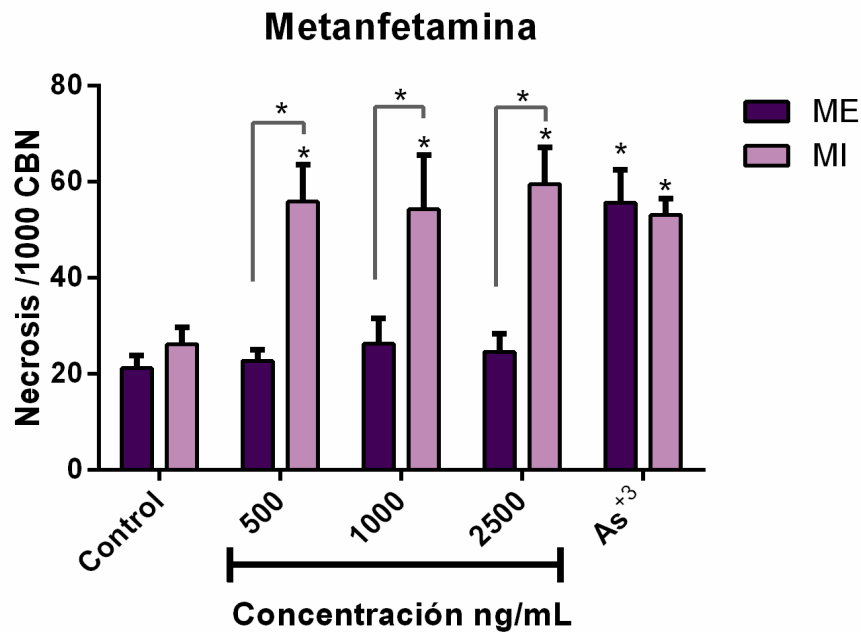
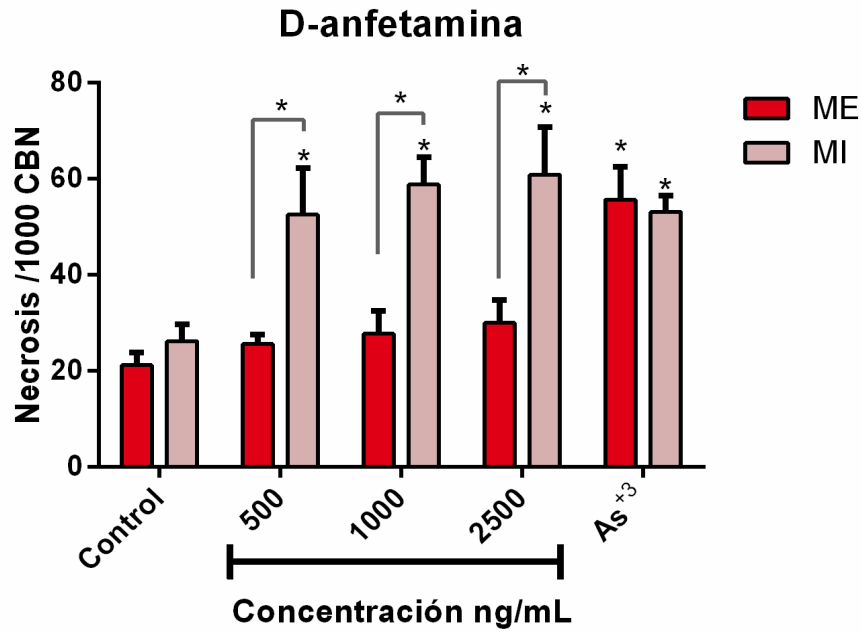


**Figura 13.** La exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina no produce aumento en la frecuencia de puentes nucleoplasmáticos por cada 1000 células binucleadas. Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6  $*1/*4$  y  $*2/*4$  ( $n=5$  por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6  $*1/*1$  y  $*1/*2$  ( $n=5$  por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control,  $* p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos.

La lectura completa del citoma permite conocer el tipo de muerte que se está produciendo en las células cultivadas. En la figura 14 se puede observar que con respecto a la frecuencia de apoptosis no hubo diferencias entre los tratamientos, ni entre los grupos de individuos. Sin embargo, llamó la atención que la frecuencia de necrosis aumentó significativamente en los linfocitos tratados con D-Anfetamina y Metanfetamina de los donadores MI, como se observa en la figura 15.



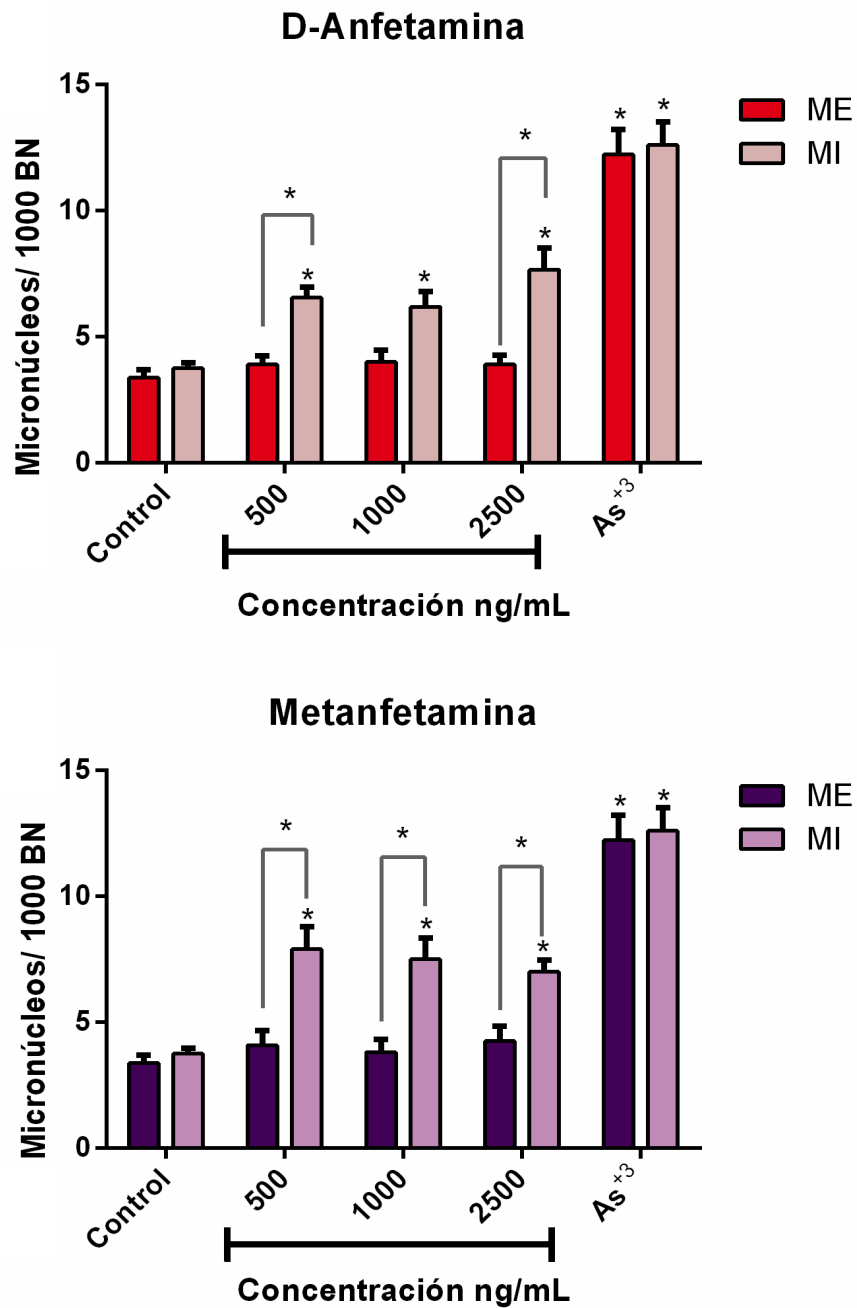
**Figura 14.** La exposición *in vitro* a D-Anfetamina y Metanfetamina no aumentó en la frecuencia de células apoptóticas por cada 1000 células. Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=5 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=5 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos.



**Figura 15. Aumento en la frecuencia de células necróticas por cada 1000 células binucleadas inducido por exposición *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina.** Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6 \*1/\*4 y \*2/\*4 (n=5 por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6 \*1/\*1 y \*1/\*2 (n=5 por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos, \*  $p < 0.05$ .

### **EFFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA.**

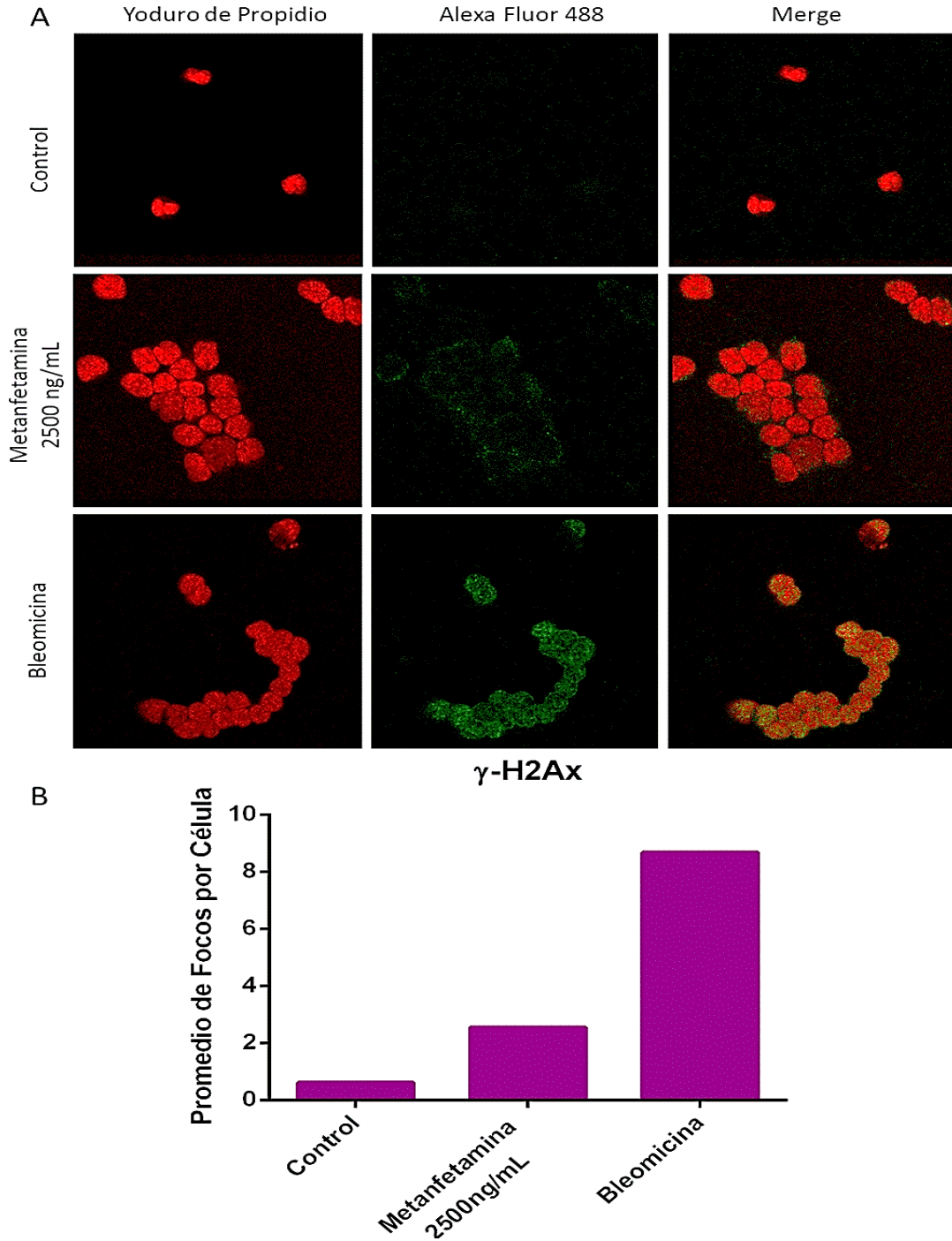
Para conocer si los compuestos anfetamínicos generan daño al DNA de la misma forma en que causan citotoxicidad en los linfocitos de donadores MI, se determinó la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos expuestos *in vitro* a D-Anfetamina y Metanfetamina. Se observa en la figura 16 que hubo un incremento en la frecuencia de MN en los linfocitos de donadores MI, mientras que en los linfocitos de donadores ME la frecuencia de MN fue similar a los controles. La frecuencia de micronúcleos en los linfocitos de donadores MI aumentó con la concentración de D-anfetamina. Mientras que en los linfocitos de donadores ME la frecuencia de micronúcleos no cambió con respecto al control. En el caso de los linfocitos tratados con Metanfetamina, se puede observar que hubo un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos de donadores MI.



**Figura 16.** El efecto genotóxico inducido *in vitro* por la exposición a D-Anfetamina y Metanfetamina está asociado al fenotipo de CYP2D6. Las barras muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6  $*1/*4$  y  $*2/*4$  ( $n=5$  por duplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6  $*1/*1$  y  $*1/*2$  ( $n=5$  por duplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Dunnet para comparación con respecto al control, \*  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos, \*  $p < 0.05$ .

### **ACTIVACIÓN DE H2AX ANALIZADO POR INMUNOFLUORESCENCIA**

Con el objeto de obtener resultados más precisos sobre el mecanismo de daño genotóxico de los compuestos anfetamínicos se realizó un ensayo preliminar para medir los focos de  $\gamma$ H2AX por medio de inmunofluorescencia, en el que se expuso *in vitro* a linfocitos de un donador Metabolizador Extenso. Se observó que existe daño de doble cadena al DNA al exponer *in vitro* a linfocitos de un donador ME a 2500 ng/mL durante 1.5 horas.



**Figura 17. Fosforilación de H2AX en linfocitos de donador ME.** (A) Imágenes representativas en microscopio confocal a 1000x. En rojo se observa el DNA teñido con Yoduro de propidio; en verde, los focos de  $\gamma$ H2AX. En la primera fila se muestra el daño a DNA basal del individuo; en la fila de en medio, daño a DNA en linfocitos de donador ME expuestos *in vitro* a 2500 ng/mL de metanfetamina durante 1.5 horas y en la última fila se muestra daño a DNA inducido por Bleomicina. (B) Promedio de focos de  $\gamma$ H2AX contabilizados por célula en 50 células.

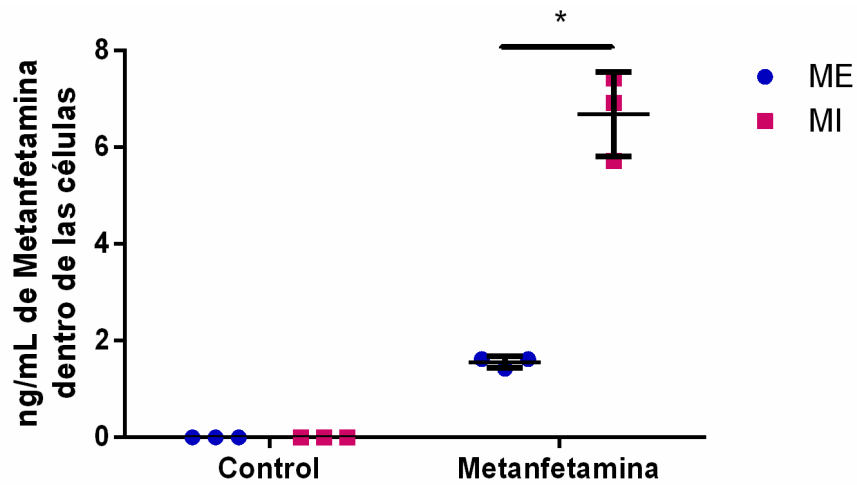


## **DETERMINACIÓN DE D-ANFETAMINA Y METANFETAMINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).**

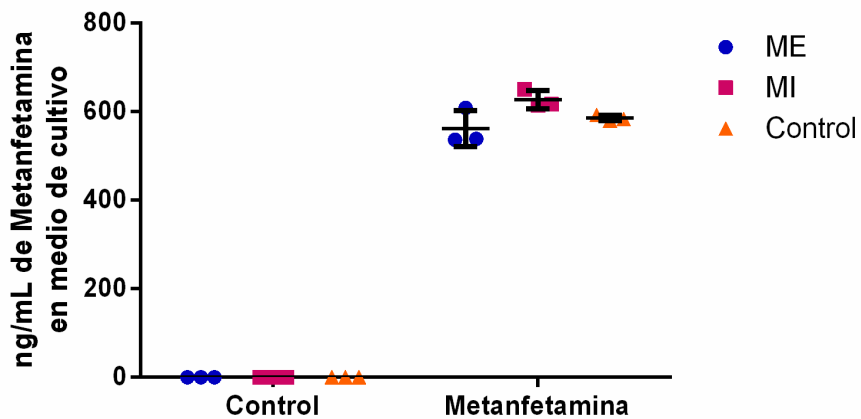
Por último, con objetivo de determinar si los efectos citotóxicos y genotóxicos observados en los Metabolizadores Intermedios se debe a que la Metanfetamina permanece más tiempo en su forma parental que en los extensos se cuantificó la Metanfetamina presente en los linfocitos de los diferentes tipos de donadores, mediante el uso de una herramienta altamente sensible, la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC).

Se encontró que hay diferencia en la concentración de Metanfetamina dentro de los linfocitos obtenidos de los donadores MI con respecto a los linfocitos de donadores ME. Estas diferencias sugieren que es menor el metabolismo de este compuesto por parte de los linfocitos de donadores MI, comprobando la capacidad disminuida del linfocito de metabolizar la Metanfetamina cuando su enzima CYP2D6 no se encuentra funcional.

A



B



**Figura 18. Concentración de Metanfetamina en cultivos de linfocitos expuestos a 1000 ng/mL de Metanfetamina en un mL de medio.** A) Metanfetamina encontrada dentro de los linfocitos. B) Metanfetamina encontrada en los medios de cultivo. Los puntos muestran experimentos independientes de un donador MI y otro ME. Las líneas muestran la media y el error estándar ( $X \pm E.E.$ ). Metabolizadores Intermedios (MI) CYP2D6  $*1/*4$  y  $*2/*4$  ( $n=1$  por triplicado). Metabolizadores Extensos (ME) CYP2D6  $*1/*1$  y  $*1/*2$  ( $n=1$  por triplicado). ANOVA de dos vías con post hoc Sidak para comparación entre grupos.

## DISCUSIÓN

Debido a las propiedades estimulantes de los compuestos anfetamínicos, la mayoría de los estudios se han enfocado a sus efectos neurotóxicos. Sin embargo, se conoce poco sobre la acción genotóxica de estos compuestos. Es importante evaluar el daño al DNA debido a que éste se ha asociado con un aumento de enfermedades crónico degenerativas, como el cáncer. Algunos estudios muestran que los efectos genotóxicos varían de un individuo a otro cuando se expone a compuestos anfetamínicos (Li, Hu, Chen, & Lin, 2003; Witt et al., 2010). Evidencia considerable demuestra que la variabilidad individual en la respuesta a los fármacos se debe a la genética (Haile et al., 2009).

En este estudio se evaluó el daño al DNA inducido por compuestos anfetamínicos en leucocitos humanos tratados *in vitro*. Basados en que se conoce que la enzima CYP2D6 se encarga del metabolismo de los compuestos anfetamínicos (Law et al., 2000), la pregunta principal de este estudio fue si el daño en DNA por D-Anfetamina y Metanfetamina dependía del genotipo de CYP2D6. Para contestar esta pregunta, realizamos estudios de genotipificación de individuos y se seleccionaron a los individuos cuyo genotipo estuviera asociado a una funcionalidad normal o baja de la enzima CYP2D6.

En particular, se ha propuesto que la Anfetamina es metabolizada por medio de hidroxilación, mientras que la Metanfetamina se metaboliza principalmente a través de N-desmetilación para producir Anfetamina e hidroxilación aromática para formar 4-hidroximetanfetamina, tales reacciones son mediadas por la enzima CYP2D6 (Carvalho et al., 2012). Además, de participar en el metabolismo de la Anfetamina y Metanfetamina, se conoce que la enzima CYP2D6 contribuye al metabolismo y/o bioactivación de aproximadamente el 25% de los fármacos utilizados clínicamente. Para muchos de los compuestos metabolizados por CYP2D6, la variación en la actividad metabólica es uno de los factores más importantes responsables de la respuesta interindividual a ellos (Hicks, Swen, & Gaedigk, 2014). Esta variación, podría ser debida a que el locus del gen CYP2D6 es altamente polimórfico y complejo, y las variantes dentro de este locus genético afectan a la función enzimática de CYP2D6, lo que da como resultado un amplio rango de actividad metabólica, desde actividad nula hasta un metabolismo ultrarrápido. Siest y colaboradores (Siest et al., 2007) midieron la expresión del RNAm de diferentes enzimas de CYP en linfocitos de 20 individuos sanos, demostrando la expresión de CYP2D6 en el linfocito humano; también encontraron que no había relación entre expresión del RNAm de CYP2D6 con la actividad de la enzima, sin embargo, no realizaron un análisis de polimorfismos del gen (Siest et al., 2007).

En nuestro estudio se encontró que los linfocitos de los individuos que tienen un fenotipo metabolizador intermedio fueron más susceptibles a los efectos citotóxicos

de los compuestos anfetamínicos que se probaron. La citotoxicidad de los compuestos anfetamínicos ha sido reportada previamente bajo diferentes condiciones y modelos de estudio. En cultivos primarios de hepatocitos tratados con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM de D-Anfetamina durante 2 horas, se encontró que la viabilidad disminuyó significativamente desde la concentración de 0.2 mM (El-Tawil, Abou-Hadeed, El-Bab, & Shalaby, 2011). También en células HepG2 se observó disminución de la sobrevivencia celular al tratar con 0.8, 1.8, 2.3 y 3 mM de Metanfetamina y con 8, 1.7, 1.9 y 2.2 mM de D-Anfetamina durante 48 horas (Da Silva, Silva, & Carmo, 2014). Sin embargo, aunque se conoce que los hepatocitos y las células HepG2 tienen un metabolismo activo por la presencia de enzimas del CYP, en los trabajos anteriores no realizó un análisis genotípico para conocer el polimorfismo presente de CYP2D6 en los modelos de estudio. En trabajos previos de nuestro grupo, se evaluó la citotoxicidad de D-Anfetamina y Metanfetamina en linfocitos de tres donadores, usando las concentraciones encontradas en consumidores de anfetaminas del sector carretero; se encontró que la viabilidad disminuyó en sólo uno de los donadores (Miranda-G., 2008; Miranda-G. et al., 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que existe disminución de la viabilidad de los linfocitos de los metabolizadores intermedios cuando son expuestos tanto a D-Anfetamina como a Metanfetamina, mostrando incluso un efecto dosis-dependiente. Cabe mencionar que las concentraciones usadas en nuestro estudio fueron en el orden de 3 a 18  $\mu$ M (500, 1000 y 2500 ng/mL), casi 1000 veces menor que las empleadas en los hepatocitos primarios y en la línea celular HepG2 (Osama S. El Tawil, 2011; da Silva 2014), indicando que en metabolizadores intermedios existe muerte celular desde dosis muy bajas. La toxicidad celular podría estar asociada a los efectos inmunosupresores de las drogas de abuso (Carvalho et al., 2012).

Un hallazgo relevante de nuestro estudio fue encontrar que los linfocitos de los individuos que tienen un genotipo de metabolizador intermedio fueron más susceptibles a los efectos genotóxicos de la D-Anfetamina y Metanfetamina. El estudio del daño en el DNA a nivel cromosómico es una parte esencial de la Toxicología Genética porque la mutación cromosómica es un evento importante en la carcinogénesis. En este estudio se analizó el daño al DNA a través del ensayo de micronúcleos, que es uno de los métodos ampliamente validados para evaluar el daño cromosómico por la pérdida cromosómica y la rotura cromosómica de manera confiable (Fenech, 2000). Además, se ha propuesto que el ensayo de micronúcleos usando citocalasina B (CBMN) puede ser utilizado como "citómetro" para medir el fenotipo de inestabilidad cromosómica integral y la alteración de la viabilidad celular por defectos genéticos y/o deficiencias nutricionales y/o genotoxinas exógenas (Fenech, 2006). En este trabajo se evaluaron todos los parámetros que abarca el CBMN, encontrando que la D-anfetamina y la Metanfetamina no afecta la

proliferación celular en ME ni en MI. Al evaluar la frecuencia de micronúcleos presentes en los linfocitos expuestos *in vitro* a D-anfetamina y Metanfetamina se encontró mayor daño en los linfocitos de donadores MI mientras que en los linfocitos de donadores ME, el daño fue similar a los controles, demostrando la susceptibilidad de los metabolizadores intermedios de sufrir daño genotóxico en exposición a concentraciones no citotóxicas de D-anfetamina y Metanfetamina. Es relevante considerar que estos hallazgos impactan directamente a la población mexicana, debido a que la frecuencia de metabolizadores intermedios y metabolizadores lentos representa el 26% en mestizo-mexicanos (López et al., 2005). Por lo tanto, probablemente, una alta proporción de la población tendría mayor riesgo de tener efectos genotóxicos inducidos por la D-anfetamina y la Metanfetamina, aún con dosis bajas.

Cabe mencionar que se midió, por la técnica de Western blot, la expresión de gamma H2AX; H2AX es una histona que se fosforila cuando existe daño de doble cadena al DNA (Kuo & Yang, 2008) funcionando así como biomarcador de daño a DNA; sin embargo aunque se observa en la técnica de CBMN un mayor daño genotóxico inducido por la D-anfetamina y Metanfetamina en los linfocitos de MI, la expresión de gamma H2AX no aumenta de forma significativa (Figura 7). Estos datos pudieran indicar que el daño causado por estos compuestos anfetamínicos no son de doble cadena del DNA, sin embargo, se deben realizar otros experimentos utilizando técnicas más sensibles, por ejemplo, el conteo de micronúcleos con sondas centroméricas o expresión de gamma H2AX por medio de inmunohistoquímica, para poder demostrar si el daño observado en forma de micronúcleos es por ruptura de la doble cadena del DNA o por aneuploidías.

Con respecto a los demás parámetros evaluados en la técnica de MN con bloqueo de la citocinesis (puentes nucleoplásmicos y gemaciones nucleares) no se encontró aumento en estos parámetros ni en los linfocitos de donadores MI, ni de donadores ME. Sin embargo, al evaluar el tipo de muerte por medio de esta técnica se observó que tanto la D-anfetamina como la Metanfetamina producen muerte por necrosis sólo en los linfocitos de MI, pero no en los linfocitos de los donadores ME. En el caso de la muerte por apoptosis, ésta no aumento su frecuencia en los diferentes tratamientos ni en ME ni MI. Estos datos son opuestos a lo reportado en la literatura, ya que se ha observado en diferentes modelos que la apoptosis es el principal mecanismo de citotoxicidad de las anfetaminas (Carvalho et al., 2012; Chen et al., 2016), debido a esto se realizó la cuantificación de la expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas, como lo son Bax y Bcl<sub>2</sub> (Kroemer et al., 2009) por medio de la técnica de Western blot, donde se encontró que no había diferencias significativas de ninguna de las proteínas evaluadas tanto en ME como en MI, sugiriendo que bajo nuestras condiciones experimentales y en el modelo del

linfocito, la muerte celular inducida *in vitro* por los compuestos anfetamínicos, está asociada a la necrosis. La evidencia experimental indica que la apoptosis, la necrosis y la autofagia están implicadas en la toxicidad aguda por metanfetamina (Chang et al., 2007; Ladenheim et al., 2000; Riddle et al., 2006); sin embargo, la inhibición de los factores relacionados con la apoptosis inhibió solo parcialmente la muerte celular inducida por metanfetamina, lo que indica que otros factores pueden desempeñar un papel en la toxicidad asociada (Kanthasamy et al., 2011). Recientemente, Xiong y colaboradores (2016), demostraron que la metanfetamina induce necrosis en neuronas de rata expuestas a dosis de 0.5 a 8 mM, indicando a la necroptosis (necrosis programada) como una posible nuevo mecanismo de citotoxicidad inducida por Metanfetamina.

Se conoce que la exposición a especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno causan muerte por necrosis (Kroemer et al., 2009) y daño a DNA (Alberts et al., 2014), también se ha reportado que la exposición a compuestos anfetamínicos generan especies reactivas tanto de nitrógeno como de oxígeno en diferentes modelos celulares (Carvalho et al., 2012; Da Silva et al., 2014; El-Tawil et al., 2011; Li et al., 2003) por lo que se propone como un mecanismo que podría causar tanto citotoxicidad como genotoxicidad. Será importante en un futuro medir la generación de ROS y RNS en donadores ME y compararlo con los generados por MI.

Con el objeto de obtener resultados más precisos sobre el mecanismo de daño genotóxico de los compuestos anfetamínicos se realizó un ensayo preliminar para medir los focos de  $\gamma$ H2AX por medio de inmunofluorescencia, en el que se expuso *in vitro* a linfocitos de un donador Metabolizador Extenso. Se observó que existe daño de doble cadena al DNA al exponer *in vitro* a linfocitos de un donador ME a 2500 ng/mL durante 1.5 horas. Las rupturas de doble cadena (DSB) representan una importante lesión en el DNA; en respuesta la histona H2AX, una variante de la histona H2A, se fosforila en la Serina 139 formando focos de  $\gamma$ H2AX detectables por microscopía de inmunofluorescencia. Existe una estrecha correlación entre los focos  $\gamma$ H2AX y el número de DSB (Löbrich et al., 2010). El tiempo de tratamiento de 1.5 horas se seleccionó con base a la fosforilación máxima de H2AX ya que posteriormente la señal de  $\gamma$ H2AX empieza a decaer (Bonner et al., 2008). Se observó que existe daño de doble cadena al DNA al exponer *in vitro* a linfocitos de un donador ME a 2500 ng/mL durante 1.5 horas. Debido al corto tiempo de tratamiento los linfocitos no han metabolizado la Metanfetamina. Estos resultados refuerzan que el compuesto parental tiene la capacidad de inducir los efectos genotóxicos. Será necesario realizar más ensayos para medir la actividad de  $\gamma$ H2AX en diferentes tiempos de exposición y en donadores MI para determinar si el daño al DNA causado por los compuestos anfetamínicos es debido a rupturas de doble cadena, que en el caso de los metabolizadores extensos al metabolizarlos son

capaces de reparar debido a que, a diferencia de los metabolizadores intermedios, son capaces de metabolizar el compuesto.

Por último, para determinar si los genotipos de CYP2D6 correlacionan con diferencias en la concentración de los compuestos parentales en los linfocitos, en este trabajo, se cuantificó la Metanfetamina dentro y fuera de los linfocitos un individuo con genotipo de metabolizador extenso y en un metabolizador intermedio. La técnica que se utilizó es una herramienta analítica altamente sensible, (Chaimbault, 2014), que nos permitió encontrar diferencias entre los donadores en la concentración del compuesto parental dentro de la célula. Así, se encontró que hay diferencia en la concentración de Metanfetamina dentro de los linfocitos obtenidos de los donadores MI con respecto a los linfocitos de donadores ME. Estas diferencias podrían sugerir que es menor el metabolismo de este compuesto por parte de los linfocitos de donadores MI, comprobando la capacidad disminuida del linfocito de metabolizar la Metanfetamina cuando su enzima CYP2D6 no se encuentra funcional. Se observó que no hay diferencia biológicamente significativa en la concentración de Metanfetamina presente en el medio celular en ninguna de las condiciones estudiadas (ME, MI y medio sin células). Sin embargo, al medir la concentración en el interior de los linfocitos de donadores ME y MI, se encontró que la concentración dentro de los linfocitos de MI es al menos 3 veces mayor que la encontrada dentro de los linfocitos de ME. El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula. Su función es transformar sus sustratos en moléculas más polares e hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables (Pikuleva & Waterman, 2013). El encontrar mayor cantidad de Metanfetamina dentro de los linfocitos de los Metabolizadores Intermedios demuestra una deficiencia en el metabolismo del compuesto por parte de los Metabolizadores Intermedios debido al polimorfismo presente en CYP2D6. Corroborando así que los efectos citotóxicos y genotóxicos observados en los linfocitos de donadores MI se deben a la diferencia en el metabolismo de los compuestos anfetamínicos con respecto a los linfocitos de donadores ME.

Finalmente, resulta relevante mencionar las bondades del modelo de estudio, ya que el uso de linfocitos en la investigación de genotóxicos es conveniente debido a que los linfocitos proporcionan células humanas accesibles, que pueden obtenerse de pacientes y voluntarios, para evaluar el genotipo y/o fenotipo de los genes a estudiar. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por Anfetamina y Metanfetamina está asociada al genotipo de la enzima que metaboliza estos compuestos. La aportación de este estudio es relevante en función de las consecuencias a largo plazo, ya que se ha establecido una asociación entre el daño al DNA y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer.

## CONCLUSIONES

- El tratamiento *in vitro* con D-anfetamina y Metanfetamina no alteró la proliferación celular.
- Los individuos con genotipo asociado a baja funcionalidad (M1) de la enzima CYP2D6 presentaron mayor daño citotóxico inducido por el tratamiento *in vitro* con D-anfetamina y Metanfetamina, esta muerte celular se asoció a necrosis.
- El tratamiento *in vitro* con D-anfetamina y Metanfetamina no generó cambios en los niveles de proteínas involucradas con el proceso de apoptosis (Bcl2 y Bax).
- Los efectos genotóxicos de los compuestos anfetamínicos dependieron del genotipo de la enzima CYP2D6, dado que, el tratamiento *in vitro* con D-anfetamina y Metanfetamina aumentó la frecuencia de micronúcleos sólo en el grupo de los metabolizadores intermedios (baja funcionalidad de la enzima).



## REFERENCIAS

- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166–177.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. (2014). Molecular Biology of the Cell. *Molecular Biology of the Cell*, 100–200. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)
- Alvarenga, T. A., Andersen, M. L., Ribeiro, D. A., Araujo, P., Hirotsu, C., Costa, J. L., ... Tufik, S. (2010). Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. *Addiction Biology*, 15(1), 96–99. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00179.x>
- Amsterdam, J. D. (2003). A double-blind, placebo-controlled trial of the safety and efficacy of selegiline transdermal system without dietary restrictions in patients with major depressive disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 64(2), 208–214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633131>
- Barenys, M., Macia, N., Camps, L., de Lapuente, J., Gomez-Catalan, J., Gonzalez-Linares, J., ... Llobet, J. M. (2009). Chronic exposure to MDMA (ecstasy) increases DNA damage in sperm and alters testes histopathology in male rats. *Toxicology Letters*, 191(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.002>
- Basu, A. K. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
- Bertilsson, L., Lou, Y. Q., Du, Y. L., Liu, Y., Kuang, T. Y., Liao, X. M., ... Sjöqvist, F. (1992). Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 51(4), 388–397. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1345344>
- Boissier, J. R., Dumont, C., Ratouis, R., & Moisy, D. (1967). [Pharmacologic study of an anorexigenic agent: furfenorex]. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 167(1), 150–162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6035092>
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., & Pommier, Y. (2008).  $\gamma$ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2523>
- Bradford, L. D. (2002). CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, 3(2), 229–243. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.2.229>
- Bray, G. A. (2000). A concise review on the therapeutics of obesity. In *Nutrition* (Vol. 16, pp. 953–960). [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00424-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00424-X)

- Brusick, D. (2013). *Principles of Genetic Toxicology* | Springer. Springer Sciences. Retrieved from <http://www.springer.com/gp/book/9780306425325#otherversion=9781489919823>
- Carvalho, M., Carmo, H., Costa, V. M., Capela, J. P., Pontes, H., Remião, F., ... De Lourdes Bastos, M. (2012). Toxicity of amphetamines: An update. *Archives of Toxicology*, 86(8), 1167–1231. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0815-5>
- Chaimbault, P. (2014). The Modern Art of Identification of Natural Substances in Whole Plants. In *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products* (pp. 31–94). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0_3)
- Chan, K.-H., Hsu, M.-C., Tseng, C.-Y., & Chu, W.-L. (2010). Famprofazone Use Can Be Misinterpreted as Methamphetamine Abuse. *Journal of Analytical Toxicology*, 34(6), 347–353. <https://doi.org/10.1093/jat/34.6.347>
- Chang, L., Alicata, D., Ernst, T., & Volkow, N. (2007). Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction*, 102, 16–32. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01782.x>
- ChemSpider | Search and share chemistry. (n.d.). Retrieved September 6, 2018, from <http://www.chemspider.com/>
- Chen, C., Qincao, L., Xu, J., Du, S., Huang, E., Liu, C., ... Wang, H. (2016). Role of PUMA in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Toxicology Letters*, 240(1), 149–160. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2015.10.020>
- Chen, P.-I., Cao, A., Miyagawa, K., Tojais, N. F., Hennigs, J. K., Li, C. G., ... Rabinovitch, M. (2017). Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. *JCI Insight*, 2(2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90427>
- Cheng, W. C., Mok, V. K. K., Chan, K. K., & Li, A. F. man. (2007). A rapid and convenient LC/MS method for routine identification of methamphetamine/dimethylamphetamine and their metabolites in urine. *Forensic Science International*, 166(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.03.011>
- Culpepper, L., & Kovalick, L. J. (2008). A review of the literature on the selegiline transdermal system: an effective and well-tolerated monoamine oxidase inhibitor for the treatment of depression. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311418>
- Da Silva, D. D., Silva, E., & Carmo, H. (2014). Combination effects of amphetamines under hyperthermia - the role played by oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology*, 34(6), 637–650. <https://doi.org/10.1002/jat.2889>

- Darke, S., Duflou, J., Lappin, J., & Kaye, S. (2018). Clinical and Autopsy Characteristics of Fatal Methamphetamine Toxicity in Australia. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1466–1471. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13710>
- De La Torre, R., Farré, M., Ortuño, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P. N., ... Cami, J. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49(2), 104–109. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00121.x>
- Dean, L. (2012). *Risperidone Therapy and CYP2D6 Genotype*. *Medical Genetics Summaries*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520384>
- Dodsworth, T., Kim, D. D., Procyshyn, R. M., Ross, C. J., Honer, W. G., & Barr, A. M. (2018). A systematic review of the effects of CYP2D6 phenotypes on risperidone treatment in children and adolescents. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*, 12, 37. <https://doi.org/10.1186/s13034-018-0243-2>
- El-Tawil, O. S., Abou-Hadeed, A. H., El-Bab, M. F., & Shalaby, A. A. (2011). D-Amphetamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Pathophysiology*, 18(4), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2011.04.001>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1–2), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>
- Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43–49. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq050>
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., ... Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fitzgerald, K. T., & Bronstein, A. C. (2013). Adderall® (Amphetamine-Dextroamphetamine) Toxicity. *Topics in Companion Animal Medicine*, 28(1), 2–7. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2013.03.002>
- Frampton, J. E., & Plosker, G. L. (2007). Selegiline transdermal system: in the treatment of major depressive disorder. *Drugs*, 67(2), 257-65; discussion 266-

7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284087>

- Frenzilli, G., Ferrucci, M., Sean, F., Blandini, F., Nigro, M., Ruggieri, S., ... Fornai, F. (2007). DNA fragmentation and oxidative stress in the hippocampal formation: a bridge between intake and long-lasting behavioral alterations. *Behavioural Pharmacology*, 471–481.
- Gaedigk, A. (2013). Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *International Review of Psychiatry*, 25(5), 534–553. <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.825581>
- González-Flores, D., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2014). TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is dependent of intracellular ROS generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 390(1–2), 281–287. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-1979-5>
- González, D., Espino, J., Bejarano, I., López, J. J., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2010). Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333(1–2), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0215-1>
- Graybel, A. (1980). Space motion sickness: Skylab revisited. *Aviation Space and Environmental Medicine* 1980, 51(8), 812–822. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/15782251\\_Space\\_motion\\_sickness\\_Skylab\\_revisited](https://www.researchgate.net/publication/15782251_Space_motion_sickness_Skylab_revisited)
- Guohong, W., & Foley, T. (2000). Composition and methods for synthesis of novel tracers for detecting amphetamine and methamphetamine in samples. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US20020090661?q=20020090661>
- Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., Ward, D. C., Radding, C. M., & Golub, E. I. (1999). Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *The Journal of Cell Biology*, 144(1), 11–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885240>
- Hagel, J. M., Krizevski, R., Marsolais, F., Lewinsohn, E., & Facchini, P. J. (2012). Biosynthesis of amphetamine analogs in plants. *Trends in Plant Science*, 17(7), 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.004>
- Haile, C. N., Kosten, T. R., & Kosten, T. A. (2009). Pharmacogenetic treatments for drug addiction: Cocaine, amphetamine and methamphetamine. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 35(3), 161–177. <https://doi.org/10.1080/00952990902825447>
- Hicks, J., Swen, J., & Gaedigk, A. (2014a). Challenges in CYP2D6 Phenotype Assignment from Genotype Data: A Critical Assessment and Call for Standardization. *Current Drug Metabolism*, 15(2), 218–232. <https://doi.org/10.2174/1389200215666140202215316>

- Hicks, J., Swen, J., & Gaedigk, A. (2014b). Challenges in CYP2D6 Phenotype Assignment from Genotype Data: A Critical Assessment and Call for Standardization. *Current Drug Metabolism*, 15(2), 218–232. <https://doi.org/10.2174/1389200215666140202215316>
- Howland, R. D., Mycek, M. J. (Mary J.), Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (Mary J. (2006). *Pharmacology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004, April). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: The past, present and future. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.007>
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal*, 5(1), 6–13. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007, December). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
- Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M. L., Sjöqvist, F., & Ingelman-Sundberg, M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 11825–11829. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11825>
- Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q. Y., Bertilsson, L., Sjöqvist, F., & Ingelman-Sundberg, M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Molecular Pharmacology*, 46(3), 452–459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935325>
- Johnson, Z., Venters, J., Guarraci, F. A., & Zewail-Foote, M. (2015). Methamphetamine induces DNA damage in specific regions of the female rat brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(6), 570–575. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12404>
- JUNET, R. (1956). Ethylamphetamine in the treatment of obesity. *Praxis*, 45(43), 986–988. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13389142>
- Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeugin, T., & Meyer, U. A. (1990). 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17209–17214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211621>

- Kanhasamy, K., Gordon, R., Jin, H., Anantharam, V., Ali, S., G. Kanhasamy, A., & Kanhasamy, A. (2011). Neuroprotective Effect of Resveratrol Against Methamphetamine-Induced Dopaminergic Apoptotic Cell Death in a Cell Culture Model of Neurotoxicity. *Current Neuropharmacology*, 9(1), 49–53. <https://doi.org/10.2174/157015911795017353>
- Klee, H. (1997). *Amphetamine misuse : international perspectives on current trends*. Harwood Academic Publishers.
- Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2002). Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(2), 277–289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897973>
- Kristen, G., Schaefer, A., & Von Schlichtegroll, A. (1986). Fenetylline: Therapeutic use, misuse and/or abuse. *Drug and Alcohol Dependence*, 17(2–3), 259–271. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(86\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0376-8716(86)90012-8)
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kuo, L. J., & Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)*, 22(3), 305–309. <https://doi.org/0258-851X/2008>
- Ladenheim, B., Krasnova, I., Deng, X., Jonathan M., O., Aldo, P., Timothy H., M., ... Jean Lud, C. (2000). Methamphetamine-Induced Neurotoxicity Is Attenuated in Transgenic Mice with a Null Mutation for Interleukin-6. *Mol Pharmacol*, 58, 1247–1256. <https://doi.org/0026-895X/00/061247-10>
- Law, M. Y. L., Slawson, M. H., & Moody, D. E. (2000). Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4- hydroxylation of amphetamine in rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(3), 348–353.
- Li, J. H., Hu, H. C., Chen, W. B., & Lin, S. K. (2003). Genetic Toxicity of Methamphetamine In Vitro and in Human Abusers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42(4), 233–242. <https://doi.org/10.1002/em.10198>
- Linder, M. W., & Valdes, R. (n.d.). Genetic mechanisms for variability in drug response and toxicity. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(5), 405–413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11499898>
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., ... Jeggo, P. A. (2010).  $\gamma$ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9(4), 662–669. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10764>
- López, M., Guerrero, J., Jung-Cook, H., & Alonso, M. E. (2005). CYP2D6 genotype

- and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61(10), 749–754. <https://doi.org/10.1007/s00228-005-0038-2>
- Masimirembwa, C., Persson, I., Bertilsson, L., Hasler, J., & Ingelman-Sundberg, M. (1996). A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 713–719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1996.00489.x>
- Meyer, U. A. (2004). Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nrg1428>
- Miranda-G., E. (2008). *Suceptibilidad individual a los efectos de los compuestos anfetamínicos y su posible relación con los polimorfismos de CYP2D6*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miranda-G., E., Sordo, M., Salazar, A. M., Contreras, C., Bautista, L., Rojas García, A. E., & Ostrosky-Wegman, P. (2007). Determination of amphetamine, methamphetamine, and hydroxyamphetamine derivatives in urine by gas chromatography-mass spectrometry and its relation to CYP2D6 phenotype of drug users. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(1), 31–36. <https://doi.org/10.1093/jat/31.1.31>
- Morton, I. K. M., & Hall, J. M. (1999). Concise Dictionary of Pharmacological Agents-A. In *Concise Dictionary of Pharmacological Agents* (pp. 2–44). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4439-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4439-1_1)
- Nakamura, K., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Ohgiya, S., Chida, M., Nagashima, K., ... Kamataki, T. (2002). CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(3), 969–973. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00328-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00328-5)
- Offei, E. B., Yang, X., & Brand-Saberi, B. (2018). The role of autophagy in morphogenesis and stem cell maintenance. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(6), 721–732. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1751-0>
- Pikuleva, I. A., & Waterman, M. R. (2013). Cytochromes p450: roles in diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17091–17098. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.431916>
- Rang, H. P., Ritter, J., & Flower, R. J. (Rod J. . (2016). *Rang y Dale. Farmacología*. Elsevier Health Sciences Spain - T. Retrieved from <https://booksmedicos.org/rang-y-dale-farmacologia-8a-edicion/>
- Ravyn, D., Ravyn, V., Lowney, R., & Nasrallah, H. A. (2013). CYP450 Pharmacogenetic treatment strategies for antipsychotics: A review of the

- evidence. *Schizophrenia Research*, 149(1–3), 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.06.035>
- Riddle, E. L., Fleckenstein, A. E., & Hanson, G. R. (2006). Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *The AAPS Journal*, 8(2), E413-8. <https://doi.org/10.1007/BF02854914>
- Rodriguez-Antona, C., Gomez, A., Karlgren, M., Sim, S. C., & Ingelman-Sundberg, M. (2010, January 8). Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Human Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0748-0>
- Saini, N., & Gordenin, D. A. (2018). Somatic mutation load and spectra: A record of DNA damage and repair in healthy human cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, (February). <https://doi.org/10.1002/em.22215>
- Salud., S. de P. Y. P. de la. (2016). Sistema de Vigilancia Epidemiologica para las Adicciones. Retrieved from [http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/info\\_sisvea/informes\\_sisvea\\_2016.pdf](http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/info_sisvea/informes_sisvea_2016.pdf)
- Schepers, R. J. F., Oyler, J. M., Joseph, R. E., Cone, E. J., Moolchan, E. T., & Huestis, M. A. (2003). Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clinical Chemistry*, 49(1), 121–132. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507968>
- Schweizerischer Apotheker-Verein. (2000). *Index nominum, international drug directory*. Medpharm Scientific Publishers.
- Shimizu, H., Takemura, N., Ando, H., Morita, M., & Machida, K. (1983). Mutagenic activity of N-nitrosomethamphetamine and N-nitrosoephedrine. *Cancer Letters*, 21(1), 63–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6640514>
- Siest, G., Jeannesson, E., Marteau, J.-B., Samara, A., Marie, B., Pfister, M., & Visvikis-Siest, S. (2007). Transcription Factor and Drug-Metabolizing Enzyme Gene Expression in Lymphocytes from Healthy Human Subjects. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(1), 182–189. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017228>
- Teh, L. K., & Bertilsson, L. (2012). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(1), 55–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185816>
- Toro, G. De. (2006). Muerte celular programada . Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Apoptosis*, (3), 1–6.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2017). *Executive summary. Conclusion and policy implications of the world drug report 2017. World Drug Report 2017*.



Retrieved from [www.unodc.org/wdr2017](http://www.unodc.org/wdr2017)

- Utrilla, P. (2000). *Aspectos farmacológicos de las anfetaminas Pharmacological Aspect of Amphetamines* (Vol. 41). Retrieved from <http://www.ugr.es/~ars/abstract/41-67-00.pdf>
- Valdes, R., & Yin, D. (Tyler). (2016). Fundamentals of Pharmacogenetics in Personalized, Precision Medicine. *Clinics in Laboratory Medicine*, 36(3), 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.05.006>
- Vasan, S., & Olango, G. J. (2018). *Toxicity, Amphetamine. StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262049>
- Villatorio-Velazquez, JA; Oliva Robles, N;Fregoso Ito, D; Bustos Gamiño, M; Mujica Salazar, A; Martín de Campo Sánchez, R; Nanni Alvarado, R; Medina-Mora, M. (2014). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas en Estudiantes 2014*. México. Retrieved from <http://www.inprf.gob.mx><http://www.uade.inpsiquiatria.edu.mx>
- Villatoro-Velázquez, JA, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Téllez-Rojo MM, Mendoza-Alvarado LR, Romero-Martínez M, Gutiérrez-Reyes JP, Castro-Tinoco M, Hernández-Ávila M, Tena-Tamayo C, A.-S. C. y G.-C. V. (2011). *Encuesta Nacional de Adicciones; Reporte de Drogas*. México. Retrieved from <http://www.uade.inpsiquiatria.edu.mx>
- Villatoro-Velázquez JA., Resendiz-Escobar, E., Mujica-Salazar, A., Bretón-Cirett, M., Cañas-Martínez, V., Soto-Hernández, I., Fregoso-Ito, D., Fleiz-Bautista, C., Medina-Mora ME., Gutiérrez-Reyes, J., Franco-Núñez, A., Romero-Martínez, M., y Mendoza-Alvar, L. (2017). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017; Reporte de Drogas*. México. Retrieved from [https://drive.google.com/file/d/1zIPBiYB3625GBGIW5BX0TT\\_YQN73eWhR/view](https://drive.google.com/file/d/1zIPBiYB3625GBGIW5BX0TT_YQN73eWhR/view)
- Ward, A. S., Kelly, T. H., Foltin, R. W., & Fischman, M. W. (1997). Effects of d-amphetamine on task performance and social behavior of humans in a residential laboratory. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 5(2), 130–136. <https://doi.org/10.1037/1064-1297.5.2.130>
- Weinshilboum, R. M., & Wang, L. (2006). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Development, Science, and Translation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 223–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162315>
- Wienkers, L. C., & Heath, T. G. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(10), 825–833. <https://doi.org/10.1038/nrd1851>
- Witt, K. L., Shelby, M. D., Itchon-Ramos, N., Faircloth, M., Kissling, G. E., Chrisman, A. K., ... Kollins, S. H. (2010). Methylphenidate and Amphetamine Do Not

Induce Cytogenetic Damage in Lymphocytes of Children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47(12), 1375–1383. <https://doi.org/10.1097/chi.0b013e3181893620.Methylphenidate>

Xiong, K., Liao, H., Long, L., Ding, Y., Huang, J., & Yan, J. (2016). Necroptosis contributes to methamphetamine-induced cytotoxicity in rat cortical neurons. *Toxicology in Vitro*, 35, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.06.002>

Yoshioka, H., Shimizu, H., Toyama, Y., Miyakoshi, Y., Suzuki, Y., & Takagi, R. (2007). Genotoxicity Study of Illegal Drug MDMA and Its Nitroso Derivative N-MDMA by Micronucleus and Chromosomal Aberration Tests using Chinese Hamster Lung Fibroblast Cell Line. *Environmental Health and Preventive Medicine*. <https://doi.org/10.1265/ehpm.12.129>

Zhou, S. F. (2009, November). Polymorphism of human cytochrome p450 2D6 and its clinical significance: Part i. *Clinical Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.2165/11318030-000000000-00000>