



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INFLUENCIA DE *CYP2D6*1/*1* Y *CYP2D6*2/*4* EN
LA CITOTOXICIDAD Y EN EL DAÑO AL DNA
INDUCIDOS POR LAS ANFETAMINAS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SEBASTIAN BOLAÑOS MARIANA POLETT



MÉXICO, D.F.

2011



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.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: **Profesor:** Marco Antonio Cerbón Cervantes

SECRETARIO: **Profesor:** Ana María Salazar Martínez

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Mauricio Rodríguez Dorantes

2° SUPLENTE: **Profesor:** Juan Francisco Palacios Espinosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 122, Edificio A del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Circuito escolar S/N

Ciudad Universitaria, Col. Copilco, C.P. 04510 Coyoacán, México, D.F.,

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ana María Salazar Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Patricia Mendoza Lorenzo

SUSTENTANTE:

Sebastián Bolaños Mariana Polett





AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por su orientación, confianza, empeño y comprensión durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Patricia Mendoza Lorenzo por su supervisión, paciencia y compromiso, pero sobre todo por las grandes enseñanzas que me hicieron crecer como persona y como profesionista.

A la QFB. Lourdes Montserrat Sordo Cedeño por su asesoría en las técnicas experimentales y por el gran apoyo brindado.

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por haberme permitido realizar este proyecto en su laboratorio.

A los miembros del jurado por sus observaciones y valiosos comentarios en la revisión de este trabajo.

- Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
- Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
- Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
- Prof. Juan Francisco Palacios Espinosa

Este trabajo recibió financiamiento de CONACYT y PAPIT-DGAPA (UNAM).

A mis amigos del laboratorio Abel, Cintia, Eddy, Erick, Fer, Gerardo, Ileana, Juanito, Mariana, Natalia, Paula y compañeros (Juan P, Lucia, Arturo) por hacer de éste un lugar alegre para trabajar. Gracias por sus grandes consejos, esas charlas interminables y divertidas salidas que compartimos, los quiero mucho.

A todos mis donadores por su gran disposición, en especial a los 6 elegidos; Fer, Lucio, Cesar, Oscar, Zabdi y Gerardo con quienes siempre estaré agradecida por su gran disposición e infinita paciencia.

Pero mi mayor agradecimiento es para la Universidad Nacional Autónoma de México que por medio de la Facultad de Química me brindo la oportunidad formarme como profesionista y como persona.





DEDICATORIAS

A mis padres:

Mami gracias por todo tu amor, comprensión, consejos pero sobre todo por el gran esfuerzo que has hecho para sacarnos adelante, estoy muy orgullosa de tener a la mejor madre del mundo.

Papi gracias por tu cariño y por esa fuerza que me has dado para luchar por mis sueños, ya que gran parte de lo que soy tú me lo has enseñado.

A mis hermanas Carmen, Edith y Karina por el gran cariño que me han demostrado durante estos años, las admiro por la fuerza que han tenido para lograr lo que se proponen. Las quiero mucho!!!

A mi niño (OSCAR) por iluminar mi vida y estar incondicionalmente a mi lado durante todos estos años, gracias por todo lo que me has dado te adoro con todo mi corazón.

A mis cuatro amigos fieles; Giovanni, Zabdi, Gabita, y Evelin, gracias por compartir conmigo los momentos más importantes de mi vida, de corazón les digo que para mí más que amigos los considero como hermanos, es una fortuna conocerlos. Los quiero muchísimo y espero contar con su amistad por siempre.

A mis amigos que en cada etapa compartida me han brindado su todo su cariño, compañía y buenos consejos: Dulce (Sanguí), Alejandra, Nelly, Isaac, Kano, Josafat, Kikin, Salvador, Erick F, Jesús A, José Juan, Páez, Ceci, Gina, Luiscocho, Ingris, Laura, Diana, Tañita, Evis, Maricela, Marisol, Gaby V, Faby, Yos, Enrique V.

Al Dr. Humberto Gasca González a quien admiro y respeto por ser un ejemplo de vida. Gracias por el apoyo brindado durante estos años.





Lo que convierte la vida en una bendición no es hacer lo que nos gusta, sino que nos guste lo que hacemos (Goethe).

Muchos de nuestros sueños al principio parecen imposibles, luego parecen improbables, pero cuando nos comprometemos firmemente, se vuelven inevitables. (Reeve)

Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida (Arthur Schnitzler).





1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
2.1. SUSTANCIAS DE ABUSO.....	14
2.1.2. SITUACIÓN EN MÉXICO.....	15
3. ANTECEDENTES.....	16
3.1. ANFETAMINAS.....	16
3.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.....	17
3.1.2. PROPIEDADES FÍSICAS.....	18
3.1.3. FARMACOCINETICA.....	18
3. 1.4. EFECTOS ADVERSOS.....	20
3.2. FARMACOGENETICA.....	21
3.3. CITOCROMO P450.....	21
3.3.1. CYP2D6.....	23
3.4. TOXICOLOGÍA.....	25
3.4.1. TOXICOGENÓMICA.....	25
3.4.2. GENOTOXICIDAD.....	26
3.4.2.1. TIPOS DE MUTACIONES EN LA MOLÉCULA DE DNA.....	26
3.4.2.2 LESIONES DEBIDAS A LA ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS.....	28
3.4.3. ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD.....	28
3.4.3.1. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	29
3.5. APOPTOSIS.....	30
4. HIPOTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35





6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
6.2. FASE I. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE CYP2D6 DE LOS INDIVIDUOS EN ESTUDIO.....	36
6.2.1. OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE LINFOCITOS.....	36
6.2.2. EXTRACCIÓN DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR.....	36
6.2.3. CUANTIFICACIÓN DE DNA.....	37
6.2.4. ENSAYOS DE PCR.....	37
6.2.4.1. PCR RFLP.....	37
6.2.4.2. PCR TIEMPO REAL.....	40
6.3. FASE II. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD, CITOTOXICIDAD Y DETECCIÓN DE APOPTOSIS.....	40
6.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	40
6.3.2. CULTIVOS DE LINFOCITOS.....	41
6.3.2.1. TRATAMIENTOS.....	41
6.3.2.2. INHIBICIÓN DE LA CITOCINESIS.....	42
6.3.2.3. COSECHA.....	42
6.3.3. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS ANFETAMINAS.....	43
6.3.4. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA.....	44
6.4. ANALISIS ESTADISTICO.....	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1. FASE I. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE CYP2D6 DE LOS INDIVIDUOS EN ESTUDIO.....	47
7.1.1. ASIGNACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS INDIVIDUOS.....	47
7.1.2. ENSAYOS DE PCR.....	47
7.2. FASE II. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD, CITOTOXICIDAD Y DETECCIÓN DE APOPTOSIS.....	51
7.2.1. EFECTO CITOTÓXICO; EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	51





7.2.2. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR (CITOSTATICIDAD).....	53
7.2.3. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD; TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS.....	53
7.2.4. EVALUACIÓN DE LA INDUCCION DE APOPTOSIS.....	55
8. DISCUSIÓN.....	57
9. CONCLUSIONES.....	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. BIBLIOGRAFIA.....	63





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de las principales variantes alélicas de <i>CYP2D6</i>	24
Tabla 2.	Claves de las variedades alélicas de las sondas TaqMan®.....	40
Tabla 3.	Características de las células teñidas con Ioduro de propidio.....	44
Tabla 4.	Fragmentos de la digestión de <i>CYP2D6*9</i>	48
Tabla 5.	Fragmentos de la digestión de <i>CYP2D6*2</i> y <i>CYP2D6*17</i>	48
Tabla 6.	Asignación del genotipo de los individuos.....	50
Tabla 7.	Frecuencia genotípica identificada en la población de estudio.....	51
Tabla 8.	Efecto de las anfetaminas en la inducción de apoptosis.....	55





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de la feniletilamina y sus dos principales derivados la anfetamina y la metanfetamina.....	17
Figura 2.	Participación de CYP2D6 en el metabolismo de la anfetamina y metanfetamina.....	19
Figura 3.	Formación de micronúcleos.....	29
Figura 4.	Ciclo de amplificación para el fragmento de 2384 pb.....	37
Figura 5.	Ciclo de amplificación para el fragmento de 386 Pb.....	38
Figura 6.	Fragmento de 360pb.....	39
Figura 7.	Detección de apoptosis.....	45
Figura 8.	Integridad del DNA genómico de individuos sanos visualizados sobre geles de agarosa al 1%.....	47
Figura 9.	Amplificación y restricción del fragmento de 386pb.....	48
Figura 10.	Plot de amplificación para las sondas 1846 y 4180.....	49
Figura 11.	Plot de discriminación alélica de la sonda 4180.....	49
Figura 12.	Efecto de las anfetaminas en la viabilidad celular a las 24 h de tratamiento.....	52
Figura 13.	Efecto de las anfetaminas en la viabilidad celular a las 48h de tratamiento.	52
Figura 14.	Efecto de las anfetaminas sobre la proliferación celular.....	53
Figura 15.	Evaluación del efecto genotóxico de los linfocitos tratados con anfetamina y metanfetamina.....	54
Figura 16.	Efecto de las anfetaminas sobre la inducción de apoptosis total en linfocitos.....	56





ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Por sus siglas en ingles
ANOVA	Análisis de varianza	
As	Arsenito de sodio	
Cyt-B	Citocalasina B	
ENA	Encuesta Nacional de Adicciones	
ELR	Ensayo de linfoma de ratón	Mouse Lymphoma Assay
SNC	Sistema nervioso central	
FDA	Administración de Alimentos y Drogas	Food and Drug Administration
FADD	Dominio de muerte celular asociado a Fas	
FS	Fosfatidilserina	
PI	Ioduro de propidio	Propidium iodide
MDMA o "Éxtasis"	<i>3,4-metilenodioximetanfetamina</i>	
MN	Micronúcleos	
M	Mitosis	
mono	Células Mononucleadas	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos a lo largo de los fragmentos de restricción	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
poli	Células Polinucleadas	
S	Síntesis	
TA	Temperatura ambiente 25 °C	
TNF	Factor de necrosis tumoral	
TDAH	Trastorno de déficit de atención con hiperactividad	Attention deficit hyperactivity disorder





1. RESUMEN

En la actualidad el consumo de sustancias de abuso representa un problema de salud a nivel mundial y nuestro país no está exento de este fenómeno, ya que en la última Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (ENA), se reporta que el consumo de sustancias de abuso está en aumento (0.7% respecto a la ENA 2002).

Entre las sustancias de abuso una de las más utilizadas son las anfetaminas, las cuales pertenecen a la familia de las aminas simpaticomiméticas de acción indirecta y son metabolizadas por CYP2D6, una enzima de la familia del citocromo P450.

La mayoría de los estudios acerca de los efectos de las anfetaminas se refieren a problemas de adicción y efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), sin embargo, son escasos los reportes sobre su metabolismo y genotoxicidad, por este motivo el objetivo de este trabajo es estudiar la relación entre los polimorfismos genéticos de la enzima que metaboliza a las anfetaminas y los efectos genotóxicos inducidos por estas drogas. Este estudio se dividió en dos fases: 1) Determinación del genotipo de *CYP2D6* de los individuos en estudio, 2) Evaluación de la genotoxicidad, citotoxicidad y la detección de apoptosis.

En la primera fase se genotipificaron 41 individuos de entre 20 y 30 años de edad, obteniéndose la siguiente distribución de los genotipos para la enzima *CYP2D6*: 56.1% para *CYP2D6**1/*1, 31.8 % para *CYP2D6**1/*2, 7.3% para *CYP2D6**2/*4, 2.4% para *CYP2D6**1/*9 y 2.4%, *CYP2D6**1/*10

En la segunda fase del estudio se evaluó el efecto genotóxico, citotóxico y citostático, además de la inducción de apoptosis, para lo cual se realizaron cultivos de linfocitos tratados con anfetamina y metanfetamina 1000 ng/ml, se seleccionaron 6 de los individuos genotipificados en la fase 1; tres individuos con el genotipo *CYP2D6**1/*1 (enzima activa) y tres individuos con genotipo *CYP2D6**2/*4 (enzima inactiva).





Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las dos anfetaminas utilizadas para este estudio presenta un efecto citotóxico, ni afectan la proliferación celular. Respecto a la inducción de apoptosis se observó un aumento significativo en los linfocitos de los individuos con el genotipo $2^*/4^*$ tratados con metanfetamina. Además, los resultados indicaron que la frecuencia de micronúcleos aumentó significativamente en los individuos que poseen el genotipo *CYP2D6* $2^*/4^*$ (inactivo).

Este trabajo aporta evidencia de que las anfetaminas producen genotoxicidad y que este efecto está relacionado con la presencia de polimorfismos genéticos en *CYP2D6*, la enzima que lleva a cabo su metabolismo.





2. INTRODUCCIÓN

2.1 SUSTANCIAS DE ABUSO

El uso y abuso de sustancias adictivas constituye un fenómeno complejo que tiene consecuencias adversas en la salud de los consumidores, la integración familiar, el desarrollo y la estabilidad social. Aunque en la actualidad todos estamos expuestos a estas sustancias, hay grupos más vulnerables a sufrir las consecuencias negativas por su consumo, tal es el caso de los niños y jóvenes, quienes pueden llegar a truncar su posibilidad de desarrollo personal y de realizar proyectos positivos de vida.

Las adicciones son un problema de salud pública que ha crecido en los últimos veinte años de manera exponencial. Drogadicción es un término general que se refiere a la incapacidad de abandonar la búsqueda de drogas; teniendo posibles aumentos en su consumo o el desarrollo de tolerancia a sus efectos placenteros, además de dependencia fisiológica o psicológica¹.

Popularmente el término droga es utilizado para referirse a sustancias de uso ilegal, el abuso de drogas ilícitas se ha definido como el uso de un producto químico para conseguir un efecto farmacológico deseado en una forma impropia, estableciendo a su vez un patrón patológico de uso.

El consumo compulsivo de estas sustancias de abuso produce dependencia psicológica, fisiológica y tolerancia, mientras que la intoxicación ya sea de forma aguda o crónica puede producir problemas físicos, psíquicos que pueden conducir a secuelas permanentes e inclusive la muerte².

2.1.1 Situación en México

Las encuestas sobre el uso, abuso y dependencia de sustancias psicoactivas, han constituido un valioso instrumento para la toma de decisiones, además de ser una ventana a través de la cual la sociedad puede observar, vigilar así como evaluar el





impacto de las acciones que se ponen en marcha para controlar este importante problema de salud pública.

En México a la fecha, se han realizado cinco encuestas nacionales sobre este tema, la primeras cuatro se realizaron en los años 1988, 1993, 1998 y 2002, mientras el año 2008 se publicó la última (realizada entre los años 2007 y 2008), en la cual se informa que el consumo de drogas ilegales (mariguana, cocaína y sus derivados, heroína, metanfetaminas, alucinógenos, inhalables y otras drogas) y médicas ha aumentado 0.7%. Por grupos de población se observa que si bien el consumo de drogas ilegales es mayor en los hombres (en una proporción de 4.6 hombres por cada mujer), el índice de crecimiento es mayor en las mujeres aumentando de 1% en 2002 a 1.9% en 2008, mientras que el consumo en hombres solamente se incrementó de 8 a 8.8%.

La mariguana y la cocaína continúan siendo las sustancias preferidas por la población, sin embargo ocurrieron incrementos importantes en el consumo de otras sustancias adictivas como el “*crack*” y las metanfetaminas, cuyo consumo aumentó seis veces³.





3. ANTECEDENTES

3.1. ANFETAMINAS

Las anfetaminas son fármacos que pertenecen a la familia de las aminas simpaticomiméticas de acción indirecta, están relacionadas estructuralmente con la noradrenalina, sin embargo sólo ejercen una acción débil sobre los receptores adrenérgicos ya que no son totalmente específicos en sus acciones. Estos fármacos tienen importantes efectos sobre el sistema nervioso central, además de gran riesgo desarrollar tolerancia, lo que justifica su tendencia a causar dependencia.

Las anfetaminas bajo uso prolongado son neurotóxicas, ocasionando la degeneración de las terminales nerviosas que contienen aminas y al final incluso podrían producir muerte celular, lo cual posiblemente se deba a la acumulación de metabolitos reactivos de los compuestos de origen dentro de las terminaciones nerviosas⁴.

En la actualidad el término anfetaminas incluye un grupo de compuestos relacionados estructuralmente como son: la anfetamina, metanfetamina, hidroxianfetamina e hidroximetanfetamina².

La anfetamina (1-metil-2-feniletilamina) fue el primer miembro del grupo en ser sintetizado (1887) sin embargo, fue muchos años después cuando se descubrió la principal actividad farmacológica de esta molécula. En 1920 se descubrió que las anfetaminas presentaban propiedades estimulantes del SNC, así como utilidad clínica en la narcolepsia y el síndrome hiperactivo en niños, pero fue en 1932 cuando la anfetamina se comercializó como descongestionante nasal y como estimulante respiratorio, para 1937 se registraron nuevos compuestos de anfetaminas como fármacos broncodilatadores, anoréxicos y antidepresivos. Paralelamente a la amplia difusión de su empleo terapéutico, se hicieron evidentes los efectos indeseables de estas sustancias y su alto potencial de abuso.





En 1959 como resultado de esto, la FDA (Administración de Drogas y Alimentos E.U.A) en un intento de frenar su alto consumo, prohibió la comercialización de varios derivados de las anfetaminas.

El abuso en el consumo de anfetaminas constituye un grave problema de salud pública, al ser las drogas de prescripción más usadas por los adolescentes y adultos y más aún que la metanfetamina es la segunda droga ilícita más popular en todo el mundo.

3.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Las anfetaminas son bases débiles cuyos pKas oscilan alrededor de 9.7-9.9, generalmente se producen por medio de síntesis química en la industria farmacéutica o en laboratorios clandestinos.

Las anfetaminas son derivados de la feniletilamina (Figura 1), la cual es la estructura base de las aminas simpaticomiméticas y otras sustancias naturales adrenérgicas como la adrenalina y noradrenalina. La anfetamina y metanfetamina se diferencian químicamente entre sí, en que la segunda presenta una sustitución de un hidrogeno en el grupo amino por un metilo (ver Figura 1), hecho que le representa un aumento en sus propiedades lipofílicas y por ende su actividad farmacológica.

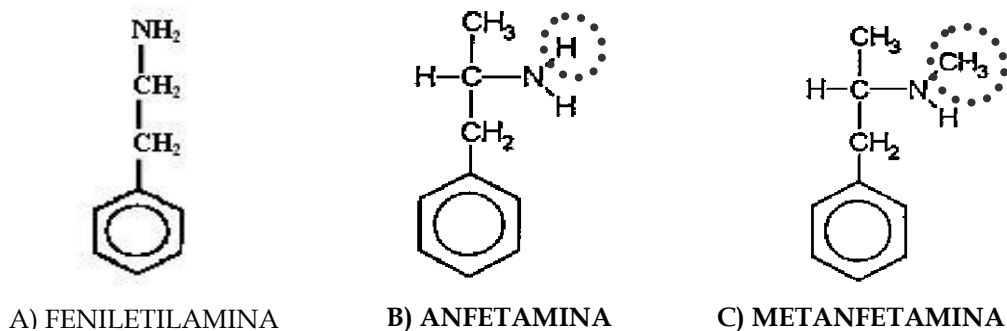


Figura 1. Estructura química de la feniletilamina y sus dos principales derivados la anfetamina y la metanfetamina.





3.1.2. PROPIEDADES FÍSICAS.

La anfetamina es un polvo cristalino, de sabor amargo, soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol, mientras que la anfetamina producida ilegalmente es un polvo fino, áspero, presenta cristales y trozos de color blanco-amarillento, olor fuerte (resultado de la depuración incompleta de reactivos y/o solventes usados en su fabricación)².

3.1.3. FARMACOCINETICA

Absorción. Las anfetaminas 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 h, 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 nervioso⁴.

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)⁵.

Metabolismo. Las anfetaminas se metabolizan mediante seis procesos químicos; hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, desanimación oxidativa, N-oxidación y conjugación con el nitrógeno. La principal enzima encargada de su metabolismo es CYP2D6^{6,7}.

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 el citocromo P450 2D6 (ver Figura 2)⁸.



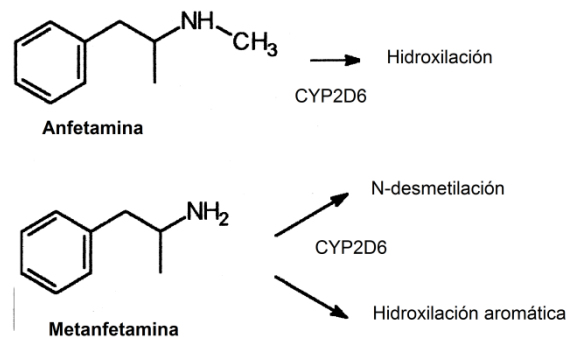


Figura 2. Participación de CYP2D6 en el metabolismo de la anfetamina y metanfetamina.

Es poco probable que los metabolitos de la anfetamina y metanfetamina contribuyan de manera significativa a los efectos clínicos sin embargo, la participación del citocromo P450 2D6 polimórfico puede contribuir a la variabilidad interindividual en el metabolismo⁸.

Eliminación. Aproximadamente un 30% de la dosis administrada es excretada intacta mediante la orina, la velocidad de eliminación varía conforme al pH urinario; en orina alcalina las anfetaminas se presentan en una forma no ionizada, por lo cual son reabsorbidas por los túbulos renales, mientras que en orina ácida se encuentran en forma ionizada por lo que su velocidad de eliminación aumenta⁴.

Efectos farmacológicos y aplicaciones clínicas. Son utilizadas principalmente en el tratamiento del trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH)⁹. También resultan ser útiles en el tratamiento de la narcolepsia, aunque su eficacia no es completa. En cuanto a su uso como inhibidoras del apetito se han dejado de utilizar debido al gran riesgo de producir hipertensión pulmonar.

En los países donde se ha permitido su consumo son utilizadas para el alivio la fatiga, levantar el ánimo, inducir furor y prolongar el insomnio. La anfetamina es aprobada por la FDA para el tratamiento TDAH y la narcolepsia mientras que la metanfetamina es aprobada para el tratamiento del TDAH y la obesidad.





Sus principales efectos son producidos al aumentar los niveles sinápticos de las aminas biogénicas como la dopamina, la norepinefrina y la serotonina a través de múltiples mecanismos¹⁰.

Efectos farmacológicos: a nivel periférico pueden causar broncodilatación, elevación de la presión arterial, vasoconstricción, aumento en la frecuencia cardiaca, inhibición de la motilidad intestinal, estimulación locomotriz, euforia además de excitación⁴.

A dosis bajas a moderadas utilizadas en algunos experimentos clínicos (5-30 mg), las respuestas sobresalientes de las anfetaminas incluyen fatiga, excitación, euforia, estado de ánimo positivo, ritmo cardíaco acelerado, presión arterial elevada, dilatación de las pupilas, aumento de la temperatura, apetito reducido, desinhibición del comportamiento y mejora a corto plazo en los dominios cognitivos incluyendo atención sostenida. En cuanto a las respuestas negativas, la ansiedad es frecuentemente reportada⁸.

3.1.4. Efectos adversos

Se sabe que la exposición de animales de experimentación a dosis agudas o altas de las anfetaminas altera las neuronas dopaminérgicas.

Las altas dosis de anfetaminas en monos producen hiperemia y hemorragia, mientras que la administración parenteral de anfetaminas en roedores puede producir hinchazón o reducción de los axones dopaminérgicos y el déficit de serotonina¹⁰.

Se ha observado que las anfetaminas causan daño neurotóxico en las neuronas corticales de ratas y éste está relacionado con las dosis administrada y el tiempo de exposición¹¹.

Los mecanismos responsables de la neurotoxicidad inducida por anfetaminas no han sido plenamente identificados, sin embargo la evidencia sugiere que los altos niveles de dopamina citoplasmática, asociada con la interrupción de anfetamina,





mediada de su almacenamiento vesicular conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo puede causar estrés oxidativo¹⁰.

La limitada utilidad clínica de las anfetaminas se contrarresta por los múltiples efectos adversos que producen entre los que se puede mencionar hipertensión arterial, insomnio, temblores, riesgo de exacerbación en la esquizofrenia y riesgo de dependencia.

Efectos generales. Insomnio, irritabilidad, debilidad, mareos, temblor, confusión, delirio, estados de pánico y las tendencias suicidas.

Efectos cardiovasculares. Palpitaciones, arritmias cardiacas, hipertensión colapso circulatorio.

Efectos gastrointestinales. Nauseas, vomito, dolor abdominal y diarrea⁵.

3.2. FARMACOGENETICA

Las variaciones individuales en las respuestas farmacológicas o toxicológicas a determinadas dosis de fármaco pueden ser influenciadas por una variedad de factores tales como el sexo, edad, función renal y hepática, interacciones fármaco-fármaco, fármaco-alimentos y la variabilidad genética.

La farmacogenómica es una ciencia que se encarga del estudio de las variaciones individuales en el genoma humano, que pueden alterar la expresión y actividad funcional de una proteína codificada, lo que se podría relacionar con las diferentes respuestas a los tratamientos farmacológicos utilizados¹².

Aunque existen múltiples factores que pueden afectar la respuesta de fármacos, algunos de estos factores predominantes son las diferencias interindividuales en la función y/o la expresión de enzimas que los metabolizan.

3.3. CITOCROMO P450

En las últimas décadas, los estudios de farmacogenómica han puesto de manifiesto que los polimorfismos genéticos de diversas enzimas pueden alterar las reacciones que se producen tras el consumo de fármacos.





El propósito básico del metabolismo de los fármacos en el organismo, es hacerlos más solubles y de esta manera facilitar su excreción. Las reacciones metabólicas que comúnmente se llevan a cabo después de la administración de un fármaco, implican la alteración de los grupos funcionales de la molécula (por ejemplo, la oxidación) a través de las enzimas del citocromo P450 ¹³.

La familia del citocromo P450 está conformada por enzimas hemotiolato con propiedades óxido reductoras conocidas como monooxigenasas. Estas enzimas son más predominantes en el hígado, pero también se pueden encontrar en intestino, pulmones y otros órganos¹⁴.

En el hombre hay alrededor de 30 enzimas del citocromo P450 que son responsables del metabolismo de diversos fármacos, se estima que alrededor del 90% de las reacciones de oxidación de fármacos se atribuyen a seis enzimas de esta familia de CYP: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 ¹⁵.

La forma sistemática de nombrar a los integrantes de la familia del citocromo P450 es usando el símbolo **CYP** como abreviatura de citocromo P450, seguida de un número arábigo (**CYP2**) que corresponde a la familia a la que pertenece (donde de manera general se asume que entre las familia la identidad y la homología estructural debe ser menor o igual al 40%), posteriormente se coloca una letra que corresponde a la subfamilia (**CYP2D**) donde la homología debe ser superior al 40%, a continuación se coloca un número arábigo que corresponde a la isoenzima (**CYP2D6**) y un asterisco (*) seguido de un número que nos describe la variedad alélica (**CYP2D6*1**) ^{2,15}.

Una mutación en alguna de las enzimas del citocromo P450 puede afectar las tasas metabólicas de los fármacos, por ejemplo, mutaciones en CYP2C9 pueden disminuir el metabolismo de la warfarina, lo que llevaría a complicaciones hemorrágicas. Algunas de las enzimas del citocromo P450 comparten los mismos mecanismos de activación, represión y regulación por lo que la presencia de polimorfismos genéticos en coactivadores, cosupresores, o reguladores pueden





afectar las tasas metabólicas de las sustancias metabolizadas por estas enzimas¹⁶.

3.3.1. CYP2D6

Uno de los polimorfismos genéticos más estudiados que se sabe influyen en el metabolismo de los fármacos es el de la enzima CYP2D6, cuyo descubrimiento estableció un nuevo interés en el papel de la farmacogenética para la práctica clínica¹².

La enzima CYP2D6 juega un papel vital en el metabolismo de aproximadamente un 25% de los fármacos de uso clínico, incluyendo muchos β -bloqueadores, antidepresivos, antipsicóticos y analgésicos. Se sabe que varios agentes farmacológicos, como la paroxetina, fluoxetina y bupropión, inhiben fuertemente la actividad enzimática de CYP2D6.

Los sustratos del CYP2D6 son bases lipofílicas con un átomo de nitrógeno protonable, presentando una alta afinidad por alcaloides¹⁷. En algunos casos, CYP2D6 podría ser la principal enzima responsable de la Fase I del metabolismo de estos sustratos.

El gen *CYP2D6* se localiza en el cromosoma 22q13.1, contiene dos pseudogenes vecinos, *CYP2D7* y *CYP2D8*. A pesar de que CYP2D6 es un polipéptido de tan solo 497 aminoácidos podría tener importantes implicaciones en el metabolismo de los fármacos.

La evolución del locus humano de *CYP2D* ha consistido en la eliminación de tres genes, la inactivación de dos (*CYP2D7P* y *CYP2D8P*) y la inactivación parcial de uno (*CYP2D6*).

Se han descrito hasta la fecha más de 100 variantes alélicas de la CYP2D6, la incidencia de polimorfismos genéticos de esta enzima ha demostrado que varía según la raza y el origen étnico. En la Tabla 1 se muestran las características generales de las variantes alélicas de *CYP2D6* más estudiadas.





Tabla1. Características de las principales variantes alélicas de CYP2D6.

EXON	POSICION ADN (www.imm.ki.se)	MUTACION	EFECTO	VARIEDAD ALELICA
1	100	C*T	P 34 S	*4,*10
2	1023	C*T	T 107 I	*17
3	1707	DEL T	FRAME SHIFT	*6
4	1846	G*A	SPLICING DEFECT	*4
5	2549	DEL A	FRAME SHIFT	*3
5	2613	DEL AGA	L 281 DEL	*9
6	2850	C*T	R296 C	*2,*17
9	4180	G*C	S 486 T	*2,*10,*17,*4

Las variantes alélicas de *CYP2D6* se pueden clasificar de acuerdo a la eliminación, disminución, aumento o alteración cualitativa de la actividad catalítica en las siguientes categorías: **metabolizadores rápidos** a los individuos homocigotos para alelos que producen enzimas con actividad normal (por ejemplo, *CYP2D6* *1); **metabolizadores intermedios o pobres** a aquellos con una o dos variantes alélicas con actividad reducida o nula.; **metabolizadores ultrarrápidos** a los individuos que llevan varias copias del gen *CYP2D6* asociados con la actividad enzimática alta. Un ejemplo de esto, es el alelo *2 el cual puede ocasionar duplicación o multiplicación del gen, dando origen hasta 13 copias adicionales en un genoma único.

Los alelos *CYP2D6* más estudiados son el alelo (*1), el alelo de alta actividad (*2xN), los alelos con funcionamiento intermedio (*10, *9, *17, *41), y los alelos no funcionales (*3, *4, *5, y *6)¹⁷.

Es importante mencionar que además de los polimorfismos genéticos, las interacciones farmacológicas también pueden influir en la actividad enzimática de *CYP2D6*.





3.4 TOXICOLOGIA

3.4.1 TOXICOGENÓMICA

Los avances sin precedentes en la biología molecular durante las dos últimas décadas han dado lugar a un aumento en el conocimiento sobre la estructura y la función del gen, estos avances a su vez conllevan una nueva subdisciplina de la Toxicología denominada "Toxicogenómica". Esta se define como el estudio de la relación estructura actividad del genoma y los efectos biológicos adversos de agentes exógenos. Esta definición incluye el estudio de los productos celulares controlados por el genoma (RNA mensajeros, proteínas, metabolitos, etc).

La diversidad genética ha sido reconocida como un factor importante en las reacciones que presenta un individuo a la exposición de una sustancia (contaminantes del medio ambiente, drogas, además de productos químicos sociales como el alcohol y el tabaco). La identificación de riesgos y análisis dosis-respuesta combinados con los estudios epidemiológicos son importantes en la evaluación de la variabilidad de riesgo individual¹⁹.

La respuesta a xenobióticos depende de numerosos eventos, cada uno presuntamente controlado por los productos de diferentes genes, los cuales pueden interactuar con factores ambientales, dando como resultado una variación particular en los efectos tóxicos²⁰.

Debido a la gran importancia de las consecuencias adversas que los agentes genotóxicos provocan en los seres vivos y dada la estrecha relación que existe entre la toxicidad genética, mutaciones, cáncer y otras enfermedades, la Toxicología Genética está desempeñando un papel importante, al utilizar sus conocimientos con fines preventivos y de esta manera contribuir a mejorar la salud pública.





3.4.2. GENOTOXICIDAD

Es importante que antes de comercializar un fármaco o sustancia química, estos sean evaluados para evitar posibles efectos adversos en la salud de los seres humanos que los consumirán. Muchas de estas sustancias resultan ser genotóxicas causando daño en el DNA, además de poder alterar la integridad de los cromosomas y la viabilidad de las células²¹.

Ya que la replicación del DNA no es un proceso totalmente perfecto, se pueden producir cambios genéticos espontáneos tanto a nivel de nucleotídico como a nivel cromosómico, por tal motivo la inducción estos cambios genéticos puede conducir a diversos efectos tales como: anomalías, malformaciones, enfermedades e incluso la muerte. Las células disponen de varios mecanismos de reparación del DNA, que pueden llevar a la eliminación de los diferentes tipos de lesiones de manera eficiente, precisa y de esta forma mantener la integridad del genoma.

Los defectos en la reparación del DNA dan lugar a: un aumento en la sensibilidad a los agentes que dañan el DNA, la acumulación de mutaciones, diversos trastornos metabólicos, muerte celular, envejecimiento acelerado, enfermedades genéticas o el desarrollo de cáncer.

En los ensayos de genotoxicidad se llevan a cabo, tanto evaluaciones *in vitro* como *in vivo*, donde se evalúan las mutaciones y aberraciones cromosómicas producidas por la exposición a diferentes agentes químicos.

El daño genético se puede clasificar en dos categorías: los efectos detectables mediante análisis citológico de los cromosomas (macrolesiones) y los cambios que ocurren a nivel nucleotídico (microlesiones).

3.4.2.1. TIPOS DE MUTACIONES EN LA MOLÉCULA DE DNA

Existen cambios que pueden ocurrir de manera espontánea, los cuales pueden originar distintos tipos de mutaciones.





Además de las mutaciones puntuales pueden producirse daños que afectan a más de una base como lo pueden ser las deleciones, inserciones, o expansión de repeticiones de tripletes. Con respecto a la función se pueden distinguir las siguientes mutaciones:

- a) Silenciosas: No se observa efecto en el fenotipo. Corresponden a cambios de bases en regiones no codificantes que no tienen secuencias reguladoras. Cambio de un codón codificante por otro codón sinónimo, sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína.
- b) Cambio en el marco de lectura. Se produce un cambio en el marco de lectura de los tripletes, por la pérdida o adición de una o dos bases (o múltiplos de dos).
- c) Sin sentido. Se deben al cambio de una base, lo que provoca que un triplete codificante se transforme en uno de paso, lo que determina la interrupción de la síntesis proteínica.
- d) De cambio de sentido. Limitado a un triplete (son las sustituciones).
- e) De elementos de control. Corresponden a mutaciones que afectan secuencias reguladoras tales como un promotor o un potenciador.
- f) De expansión de repetición de tripletes. Aumento en el número de copias de un trinucleótido, en los últimos años reconocido como factor implicado en varias enfermedades hereditarias humanas.

Las mutaciones espontáneas se deben fundamentalmente a errores durante la replicación del DNA y pueden ser promovidas por la propia inestabilidad química de la molécula de DNA. Además de los errores derivados de la replicación hay que tener en cuenta los errores en la reparación e incorporación de bases modificadas que presenten propiedades ambiguas de reparación²².





3.4.2.2. LESIONES DEBIDAS A LA ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

Distintos agentes físicos y químicos son capaces de producir lesiones en el DNA, si estas no son reparadas pueden convertirse en mutaciones. El primer agente mutagénico conocido fue los rayos X, posteriormente se comprobó que la luz UV y todas las radiaciones ionizantes (rayos X, alfa, beta, gama, etc.) son mutagénicas en todos los organismos y capaces de inducir tanto mutaciones génicas como cromosómicas, en general su efecto es acumulativo²³.

Respecto a los agentes químicos, el gas mostaza y sus derivados fueron los primeros mutagénos químicos descubiertos. Actualmente existen un gran número de agentes químicos capaces de modificar los nucleótidos. Resulta importante mencionar que las mutaciones son producidas al azar (independientemente del tipo de agente mutagénico), es decir que aunque el agente mutagénico tenga un mecanismo de acción determinado, el nucleótido afectado puede estar en cualquier posición²².

3.4.3. ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD

A través de los años varias pruebas validadas se han empleado para la evaluación de los efectos genotóxicos; las más utilizadas en ensayos *in vitro* son la prueba de Ames y el ensayo de linfoma de ratón (ELR) en las cuales se realiza la detección de mutaciones genéticas²⁴.

Para detectar el daño cromosómico causado por diversas sustancias se realizan diversos ensayos, entre los más utilizados se encuentra; la detección de aberraciones cromosómicas y la técnica de micronúcleos mediante el bloqueo de la citocinesis, en algunos estudios el ensayo cometa es comúnmente utilizado para la detección de este tipo de daño²⁵.





3.4.3.1. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de micronúcleos (MN) es ampliamente utilizado como una prueba *in vitro* de genotoxicidad. En los seres humanos, la mayoría de los estudios de MN se realizan en cultivos de linfocitos de sangre periférica.

Los MN se forman de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas o cromosomas enteros que se quedan rezagados en anafase, por lo que permanecen fuera de los núcleos hijos en telofase²⁶.

El ensayo de MN mediante el bloqueo de la citocinesis, se basa en la inhibición de la citocinesis al agregar citocalasina B (Cyt-B) la cual es un inhibidor del ensamblaje de microfilamentos, por lo que se evita la separación citoplasmática de las células después de la división celular, éste hecho facilita el análisis de MN al poder observarse células binucleadas (BN) (ver Figura 3), las cuales son células que han completado su primera división después del tratamiento con el agente de prueba o después de la iniciación de los cultivos.

Los dos fenómenos básicos que conducen a la formación de MN en las células mitóticas son producidos por rupturas cromosómicas o la disfunción del aparato mitótico.

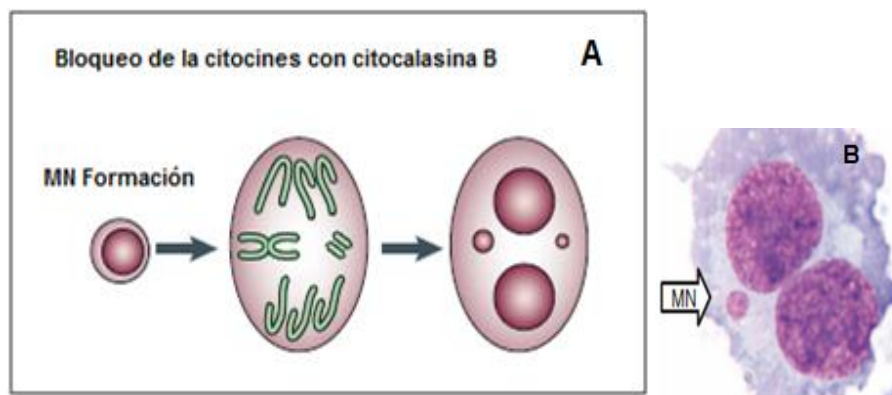


Figura 3. Formación de micronúcleos. A) Mecanismo de formación de micronúcleos mediante el bloqueo de la citocinesis. B) Imagen microscópica de un micronúcleo²⁷.





3.5. APOPTOSIS

Todos los seres vivos tiene como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones. Las células al reproducirse tendrán que asegurar que todo su material genético se reparta en forma equitativa entre las células hijas resultantes.

Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular, el cual está determinado por cinco fases diferentes: la fase S (síntesis) en la que se asegura la duplicación del DNA, la fase M (mitosis) en la cual el DNA se reparte exactamente entre dos núcleos, las fases G_1 y G_2 que son fases en donde ocurren múltiples procesos regulatorios del ciclo celular, que anteceden a las fases de síntesis y mitosis respectivamente, por último ocurre la citocinesis, en la cual se realiza la división del citoplasma, para a la formación dos nuevas células hijas idénticas ²⁸. Existe un balance entre el ciclo celular y la apoptosis debido a esto es importante conocer la relación que existe entre ambos procesos.

Durante el final de la fase G_1 , puede darse inicio a la apoptosis para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis, de manera que las mutaciones no se copien durante la replicación del DNA, por su parte en la fase G_2 puede iniciarse para impedir que las células que no han llegado a la madurez entren en mitosis²⁹.

La apoptosis es una forma de muerte celular en organismos eucariotas. Este fenómeno tiene un papel fundamental durante la embriogénesis, el control homeostático, la regresión del tumor y el desarrollo de la respuesta inmune. Puede dar inicio en varias circunstancias incluyendo, aunque no de forma exhaustiva la lesión del DNA por radiaciones o por toxinas químicas, la activación de una respuesta de estrés, la desaparición de los factores de crecimiento, y la activación de receptores de transmisión de señales específicos.





En la célula una serie de cambios bioquímicos y morfológicos se producen al recibir estas señales específicas. Una familia de proteínas conocidas como caspasas, se activan en las primeras etapas de la apoptosis. Estas proteínas se unen a sustratos celulares clave que son necesarios para la función celular normal, el resultado de estos eventos bioquímicos es la aparición de cambios morfológicos en las células y en el DNA³⁰.

Dos son las principales vías que producen apoptosis y ambas culminan en un programa de muerte común: la vía mitocondrial o intrínseca y la vía del receptor de muerte celular o extrínseca.

Vía mitocondrial. Supone la inducción de proteínas especializadas que estimulan la permeabilidad mitocondrial, lo que da lugar a la liberación de proteínas inductoras de la muerte celular que normalmente están secuestradas dentro de las mitocondrias.

Las proteínas antiapoptóticas multidominio como Bcl-2 y Bcl X_L contribuyen a la estabilidad mitocondrial, por su parte las proteínas Bax y Bak cuando son activadas pueden alterar la integridad de la membrana externa.

Diversos estímulos inducen y activan a diferentes proteínas mediante mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, la lesión del DNA contribuye a la inducción transcripcional mediada por p53, de genes que codifican proteínas con un dominio BH3 llamadas Puma y Noxa.

La generación de las formas activas de las proteínas con un dominio BH3 puede poner en marcha una serie de fenómenos que producen permeabilidad mitocondrial, lo que da lugar a la liberación de proteínas inductoras de apoptosis que inexorablemente llevan a la célula a la vía de muerte común.

Vía del receptor de muerte celular. Varios receptores triméricos de la superficie celular de la familia del receptor del TNF (factor de necrosis tumoral) pueden inducir la apoptosis cuando se unen a sus ligandos fisiológicos, estos receptores





se denominan genéricamente receptores de muerte celular y su prototipo como factor de muerte celular es Fas. La porción intracelular de Fas contiene un dominio de interacción proteína-proteína conocido como dominio de muerte celular.

Una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte celular, denominada FADD (Dominio de muerte celular asociado a Fas), une Fas a otra caspasa iniciadora (la procaspasa 8) en la cara interna de la membrana plasmática. De este modo, la ocupación de Fas por FasL da lugar a la activación de la caspasa 8 y en consecuencia a la inducción de apoptosis³¹.





4. HIPOTESIS

Ya que las anfetaminas son metabolizadas por CYP2D6, la presencia de polimorfismos genéticos de esta enzima podría influir en la genotoxicidad producida por estas, en especial polimorfismos que producen una enzima inactiva, tal es el caso de CYP2D6*4.





5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la anfetamina y metanfetamina en el daño al DNA y su posible relación con los polimorfismos genéticos de CYP2D6.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de los polimorfismos genéticos de *CYP2D6* *2, *3, *4, *6, *9, *10, *17 en la población de estudio, mediante PCR en tiempo real y PCR-RFLP.
- Identificar individuos con el genotipo asociado a la inactividad de CYP2D6 (*CYP2D6**3, *CYP2D6**4).
- Determinar la influencia del genotipo inactivo de *CYP2D6* en la proliferación celular y en el efecto citotóxico producido por las anfetaminas en cultivos de linfocitos.
- Evaluar la genotoxicidad producida por las anfetaminas *in vitro* y correlacionar el daño con el genotipo inactivo de *CYP2D6*.
- Detectar la inducción de apoptosis por las anfetaminas y correlacionar este efecto con el genotipo inactivo de *CYP2D6*.

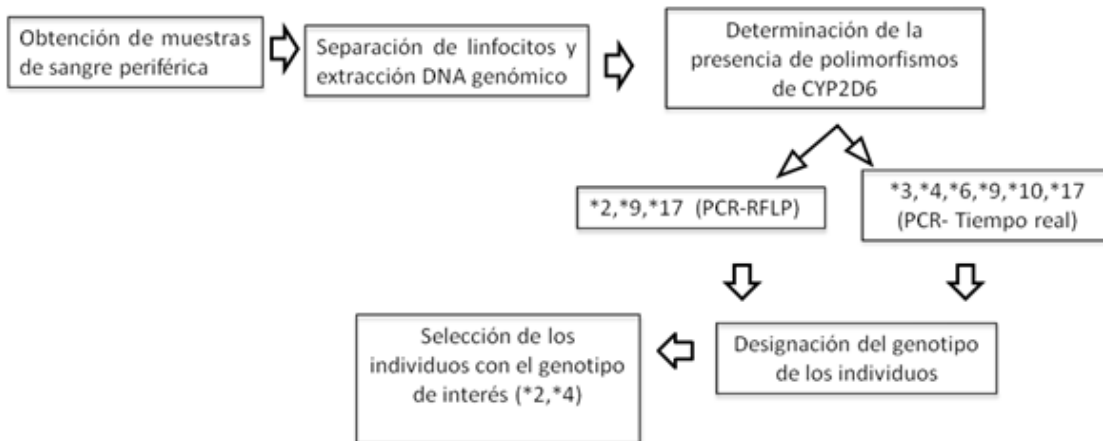




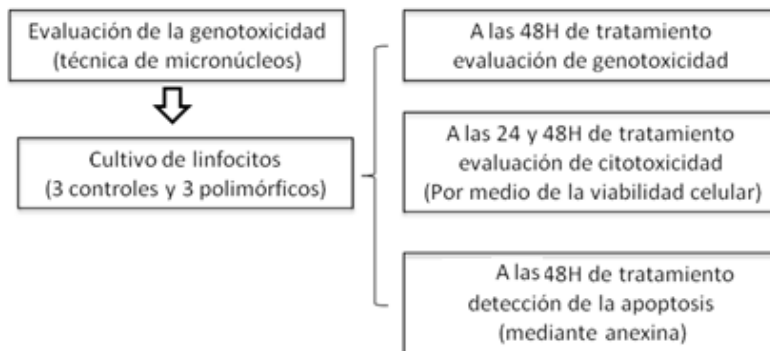
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

FASE I



FASE II





6.2. FASE I. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE CYP2D6 DE LOS INDIVIDUOS EN ESTUDIO.

6.2.1. OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE LINFOCITOS

Se llevó a cabo la recolección de las muestras de sangre periférica de 41 individuos sanos de entre 20 y 30 años, mediante punción venosa con Vacutainer® y el uso de tubos con Sodio/Heparina. El anillo de células blancas fue recuperado mediante gradientes de densidad con Ficoll (Histopaque 9327) y centrifugación a 1600 rpm por 30 minutos. Posteriormente estas células fueron lavadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) y centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos eliminando el sobrenadante.

6.2.2. EXTRACCIÓN 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, MgCl₂ y Na₂EDTA) y Nonidet P-40 (IGEPAL). Después de un ligero vortex, los tubos fueron centrifugados a 2200 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Un lavado más fue realizado únicamente con la solución TKM1. Posteriormente el botón nuclear fue re-suspendido con la solución TKM2 (Tris, KCl, MgCl₂ y Na₂EDTA, NaCl), se les agregó SDS al 10% y se incubaron a 65°C por 8 minutos. Una solución de NaCl 6M fue adicionada a cada uno de los tubos y tras un ligero vortex, fueron centrifugados a 13 000 rpm por 10 minutos. En esta etapa se recuperó el sobrenadante el cual contenía al DNA 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.





6.2.3. CUANTIFICACIÓN DE DNA.

Las muestras de DNA previamente almacenadas, fueron descongeladas a temperatura ambiente (TA) y cuantificadas en un espectrofotometro NanoDrop® (ND-1000) a partir de 2 µL de cada una de las muestras. La integridad del DNA fue evaluada en geles de agarosa al 1.0 %.

6.2.4. ENSAYOS DE PCR

6.2.4.1. PCR RFLP.

La determinación de los alelos de *CYP2D6* *2, *9, *17 fue realizada por la técnica de PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismos a lo largo de los fragmentos de restricción).

Amplificación del Gen *CYP2D6*.

Fragmento de 2384 pb.

Las reacciones fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones; 0.75µl de MgSO₂ (50 mM), 0.25 µl de dNTP's (10 mM), 2.5 µl de P51, 2.5 µl de PM2, 0.25 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/uL) (Invitrogen), 2.5 µl de 10X High Fidelity PCR buffer, 14.25 µl de agua destilada y 3 µl de DNA (50 ng/µl). La amplificación se llevó a cabo en el equipo PCR System 9700 conforme al ciclo de amplificación que se indica en la Figura 4. El producto de PCR se verificó en geles de agarosa al 1% mediante electroforesis.

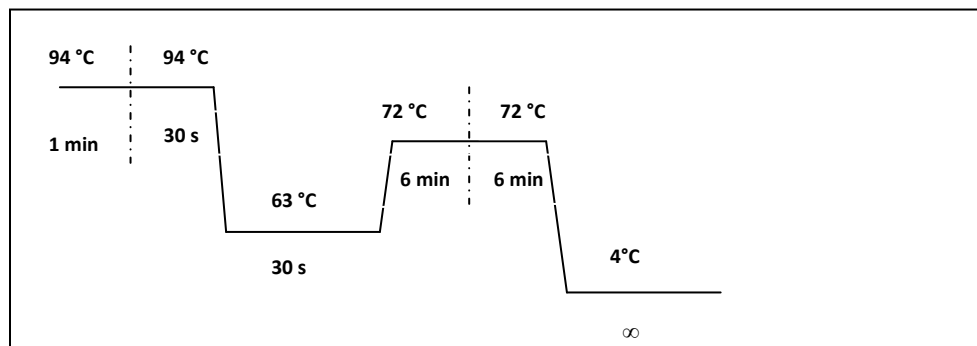


Figura 4. Ciclo de amplificación para el fragmento de 2384 pb.





Fragmento de 386 pb

Se trabajo bajó las siguientes condiciones: 0.75 μ l de MgSO₂ (50 mM), 0.25 μ l de dNTP's (10mM), 2.5 μ l de PM7, 2.5 μ l de PM8, 0.25 μ l de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) ,2.5 μ l de 10X High Fidelity PCR buffer, 14.25 μ l de agua destilada y 3 μ l del amplificado de 2384 Pb, el ciclo de amplificación de este fragmento se muestra en la Figura 5. El producto de PCR se confirmó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 3%.

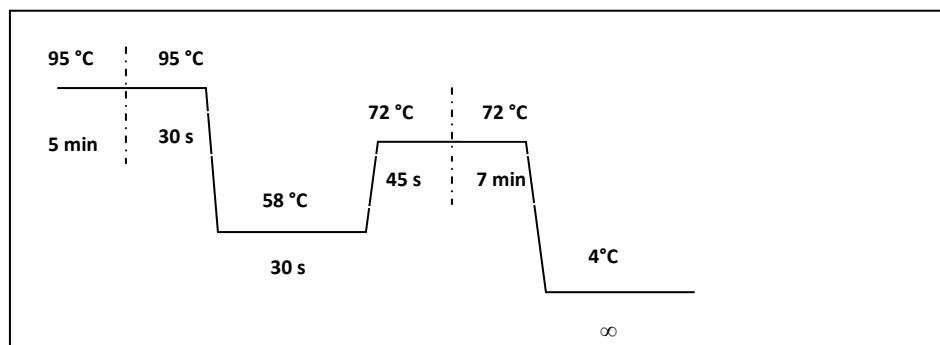


Figura 5. Ciclo de amplificación para el fragmento de 386 Pb.

Restricción.

La restricción se llevo a cabo en la siguiente mezcla de reacción: 3 μ l del fragmento de 386 pb, las enzimas de restricción BspM1 y MboII, Buffer 2 y agua destilada hasta completar un volumen total de 15 μ l. Lo anterior se incubó por 12 h a 37 °C, transcurrido el tiempo el producto de la restricción se corrió en geles de agarosa al 3%. En la Figura 6 se muestra el fragmento de 386pb con los sitios de restricción que reconocen las enzimas BspM1 y MboII y la posición de los polimorfismos de interés.





LOCUS HUMCYP2D6 9432 bp DNA linear PRI 22-NOV-1994
DEFINITION Human cytochrome P450 IID6 (CYP2D6) gene, complete cds.
ACCESSION M33388
VERSION M33388.1 GI:181303
KEYWORDS cytochrome P450; cytochrome P450 IID6.
SOURCE Homo sapien

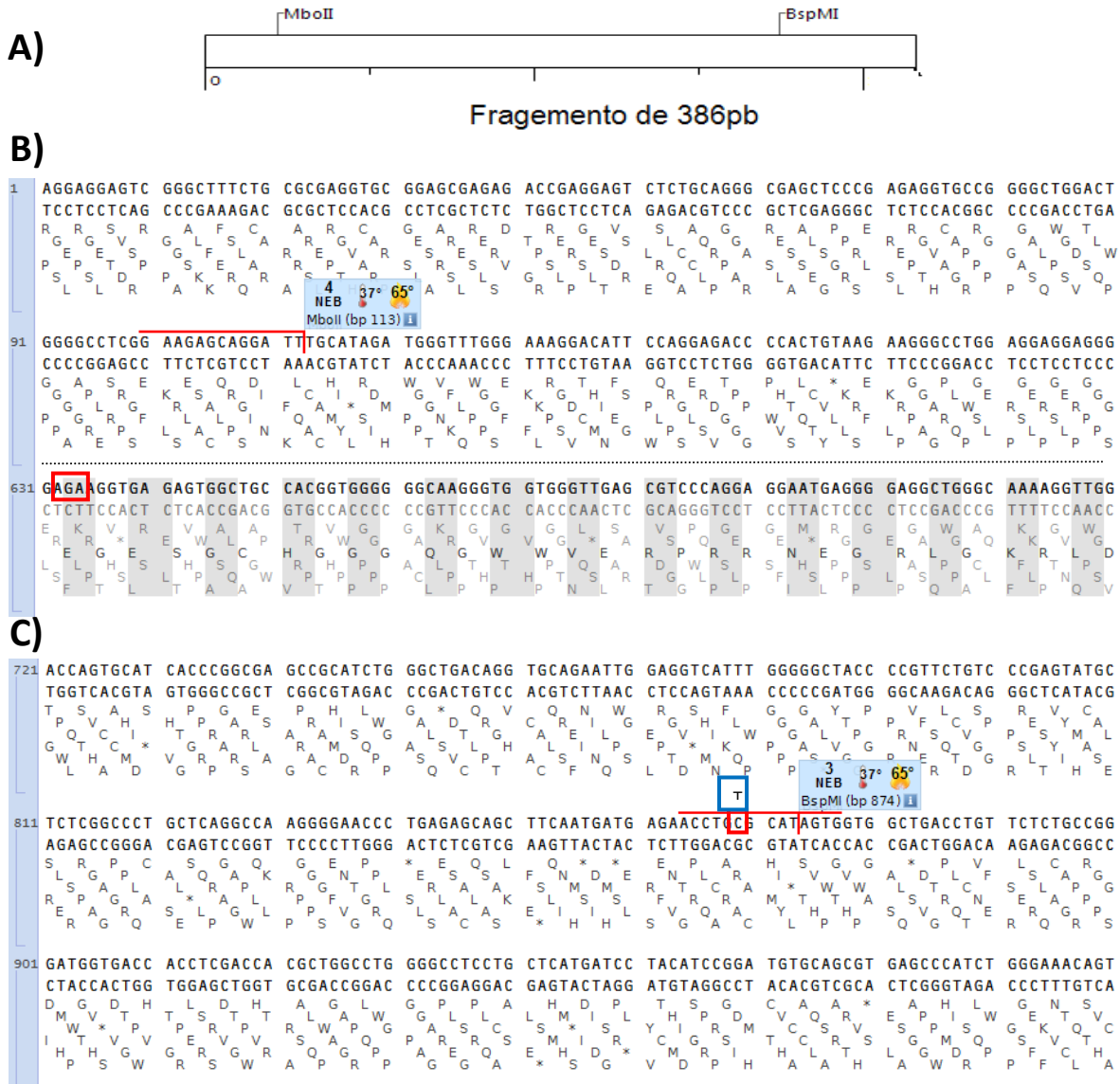


Figura 6. A) Fragmento de 360pb. B) Sitio de restricción de la enzima MboII y delección de AGA en la posición 2613 (las líneas punteadas representan un fragmento del gen que no fue incluido en la figura). C) Sitio de restricción de la enzima BspMI y cambio de C/T en la posición 2850.





6.2.4.2. PCR TIEMPO REAL.

Para las variedades alélicas CYP2D6 *2,*3,*4,*6,*10,*17.

Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de DNA (concentración 20 ng/µl), 10 uL de TaqMan® Maxter mix, 0.5 µl de sonda TaqMan® de acuerdo a la variante alélica analizada (ver Tabla 2) y 4.5 µl de agua destilada en un volumen total de 20 µl por reacción.

Tabla 2. Claves de las variedades alélicas de las sondas TaqMan®.

Clave de la sonda TaqMan®	VARIEDAD ALÉLICA	MUTACION
100	*4,*10	C*T
1023	*17	C*T
1707	*6	DEL T
1846	*4	G*A
2549	*3	DEL A
4180	*2,*10,*17,*34	G*C

6.3. FASE II. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD, CITOTOXICIDAD Y DETECCIÓN DE APOPTOSIS

6.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Por medio de punción venosa, se extrajo sangre periférica de 3 individuos controles (*1,*1) y 3 individuos polimorfismo de interés (*2,*4), a los cuales se les realizó la separación de linfocitos como se indicó en la fase I.

Se preparó un stock de linfocitos re-suspendidos en medio RPMI para el conteo celular, se mezclaron 5 µl del stock celular mas 195 µl del reactivo Guava ViaCount®. La reacción se incubó 10 minutos en la obscuridad y se leyó en el equipo Guava Technologies Inc.





6.3.2. CULTIVOS DE LINFOCITOS

Se sembraron 5×10^5 células/ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10 % de SFB (Suero Fetal Bovino), aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco), L-glutamina 2 mM (Sigma) y fitohemaglutinina (PHA). Estos cultivos de linfocitos se incubaron a 37° C durante 24 h, tiempo en que se les aplicó su respectivo tratamiento. Se realizaron tres experimentos independientes para cada uno de los donadores.

6.3.2.1. TRATAMIENTOS

La metanfetamina y anfetamina fueron obtenidas de la casa comercial *CERILLIANT*, la cual suministró los estándares con información documentada de su caracterización, lo que incluyó análisis por espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Los tratamientos con la anfetamina y la metanfetamina, fueron establecidos conforme a las concentraciones reportadas en orina de quienes consumen este tipo de drogas en dosis terapéuticas².

Las concentraciones de anfetamina y metanfetamina que finalmente se aplicaron, correspondieron a 1000 ng/ml. Los tratamientos que fueron aplicados se muestran a continuación:

A: Control negativo: Cultivo sin tratamiento.

B: Anfetaminas 10µl por cada ml de medio (C=1000 ng/ml / 7.4 µM).

C: Metanfetamina 10µl por cada ml de medio (C=1000 ng/ml / 6.7 µM).

D: Control positivo: Arsenito de sodio (As) (2.5µM). Agente que induce daño en el DNA a esa concentración.





6.3.2.2. INHIBICIÓN DE LA CITOCINESIS

Pasadas las 24 h de tratamiento se adicionó a cada cultivo 3 μ l/ml de citocalacina B, los cultivos se volvieron a incubar a 37 °C durante 24 h.

6.3.2.3. COSECHA

Al termino de las 48 h con el tratamiento, se realizó la cosecha de los linfocitos, los cuales se re-suspendieron, fijaron y lavaron con una solución de Metanol-Acido Acético 3:1 (solución fijadora).

Una porción de las células fijadas se colocó y distribuyó uniformemente 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).

Para la identificación de micronúcleos en células BN se siguieron los siguientes criterios aceptados en estudios internacionales³².

Criterios para identificar células binucleadas.

- Los dos núcleos deben presentar la membrana nuclear intacta y deben situarse dentro del límite citoplasmático.
- Los dos núcleos deben ser aproximadamente del mismo tamaño y con la misma intensidad de tinción.
- Los dos núcleos pueden estar unidos por un puente nucleoplasmático fino, el cual no debe ser mayor que $\frac{1}{4}$ del largo del diámetro nuclear.
- Los dos núcleos pueden traslaparse, sin embargo debe distinguirse la membrana nuclear de cada uno.
- La membrana citoplasmática debe estar intacta y ser claramente distinguible de las células adyacentes.





Criterios para la identificación de micronúcleos.

- El diámetro de un MN en linfocitos humanos debe considerarse entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal el cual corresponde a 1/9 del área en la célula BN.
- Son de forma redonda u oval.
- No deben refringir para su distinción de artefactos teñidos.
- No deben estar unidos o conectados al núcleo principal.
- Deben presentar la misma condensación que los núcleos.

Siguiendo los criterios antes mencionados se llevo a cabo el conteo de células BN (1000 por laminilla) se reportan los micronúcleos encontrados # MN/1000 células binucleadas. Para la evaluación de la proliferación celular se realizo el conteo de 200 células tanto mononucleadas (mono), binucleadas y polinucleadas (poli). El índice de proliferación nuclear (IPN) se calculo como se indica a continuación.

$$IPN = \frac{N^{\circ} \text{ de Celulas mono} + 2 (N^{\circ} \text{ de CelulasBN}) + 3 (N^{\circ} \text{ Celulas poli})}{\text{Total de celulas contadas}}$$

6.3.3. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS ANFETAMINAS

Para la evaluación del efecto citotóxico de los compuestos utilizados, se analizó la viabilidad del las células a las 24 h y 48 h de tratamiento, mediante el ensayo **Guava ViaCount el cual utiliza** Ioduro de Propidio (PI) para teñir las células muertas, ya que es un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos incrementando sensiblemente su fluorescencia, mientras que en las células vivas la integridad de la membrana no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente nos tiñe las células que tengan dañada su membrana (muertas) o los núcleos aislados (ver Tabla 3).





Para el ensayo de viabilidad se tomaron 10 µl del cultivo y 190 µl Guava ViaCount®, la reacción se incubó 10 minutos en la obscuridad y se leyó en el equipo Guava Technologies Inc.

Tabla 3. Características de las células teñidas con PI.

	Desechos	Células viables	Células muertas	Apoptosis
Dispersión frontal	Baja	Alta	Alta	Alta
Tinción Nuclear	Negativa	Alta	Alta	Alta
Tinción de viabilidad	Negativa	Negativa	Alta	Media

6.3.4 DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA

La muerte celular es un proceso fisiológico que se encuentra controlado por distintas vías de señalización, las cuales convergen en la apoptosis, la cual es un proceso en el que determinadas células dirigen su propia muerte en beneficio del organismo. Durante la apoptosis, las células responden a las señales de inducción específica una vez que inician los procesos intracelulares que resultan en cambios fisiológicos tales como;

- Externalización de la fosfatidilserina a la superficie celular
- La escisión y la degradación de proteínas celulares específicas
- Compactación y fragmentación de la cromatina nuclear
- La pérdida de la integridad de la membrana³¹.

Para ello se han desarrollado metodologías como el ensayo Guava Nexin™, en el cual se utilizaron los reactivos Anexina V y 7-AAD.





La anexina-V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina (FS) y el reactivo 7-AAD es un fluorocromo que indica la integridad de la estructura de la membrana, ya que se une al material nuclear que se encuentra libre después de la ruptura o pérdida de la permeabilidad de la membrana (Ver Figura 7).

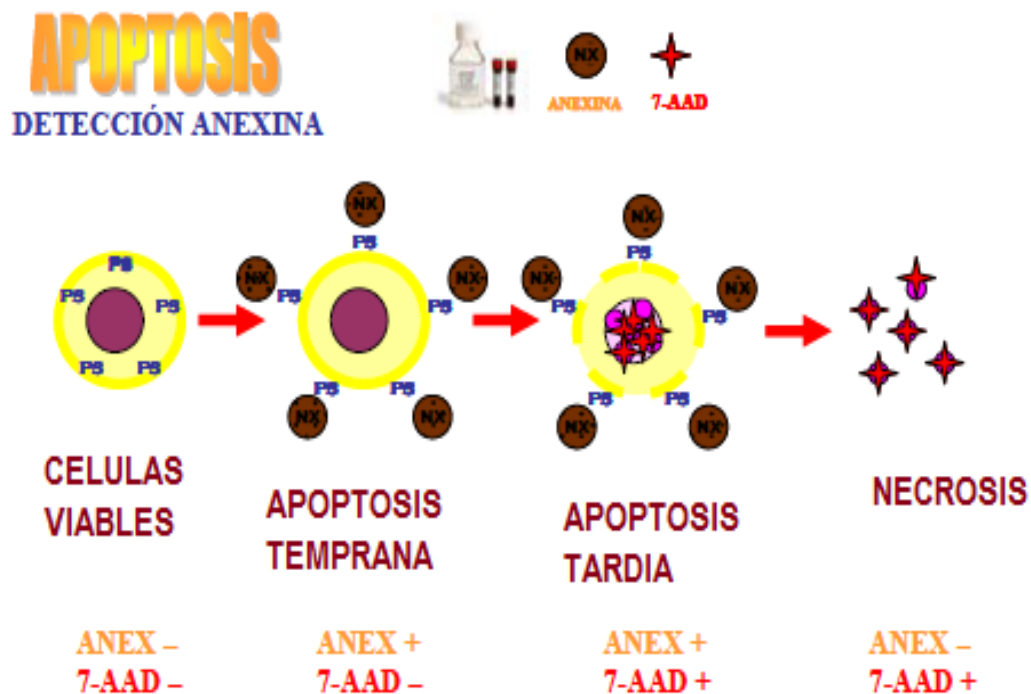


Figura 7. Detección de Apoptosis; Esquema que muestra las fases para la detección de apoptosis usando Anexina y 7- AAD.

Para la determinación de la inducción de apoptosis, se tomaron 190 µl de cultivo y centrifugaron a 1400 RPM durante 6 minutos, se eliminó el sobrenadante, las células se re-suspendieron en 40 µl Buffer Nexin® 1X, se adicionó Anexina V y 7-AAD, la reacción se incubó 20 minutos en la oscuridad, pasado este tiempo se les añadió 120 µl de Buffer Nexin® 1X. La muestra se analizó en el equipo Guava Technologies Inc.





6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico de resultados obtenidos en la evaluación de la viabilidad celular, proliferación celular, frecuencia de micronúcleos y la inducción de apoptosis, para lo cual se partió con la determinación de la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Tanto la viabilidad celular, como la proliferación celular y la frecuencia de micronúcleos mostraron una distribución normal, por lo cual se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) mediante pruebas de comparación múltiple de Tukey, por su parte los resultados de apoptosis no mostraron una distribución normal, debido a esto se aplicó la prueba estadística de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, en ambas se determinó si los datos son significativamente distintos, para lo cual debían tener una $p < 0.05$.





7. RESULTADOS

7.1. FASE I

7.1.1 ASIGNACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS INDIVIDUOS.

En esta fase se realizó la genotipificación 41 individuos sanos. En la Figura 8 se presentan los geles de agarosa representativos de las muestras de DNA extraídas.

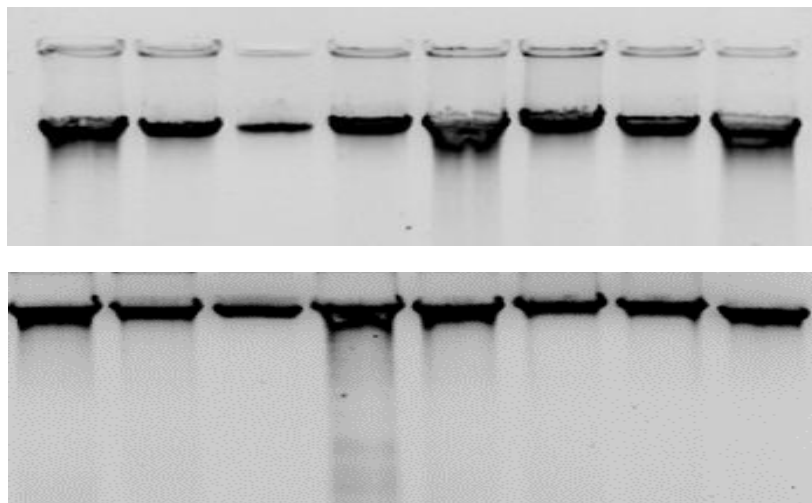


Figura 8. Integridad del DNA genómico de individuos sanos visualizados sobre geles de agarosa al 1%.

7.1.2. ENSAYOS DE PCR

PCR-RFLP: Esta técnica se utilizó para la detección de los polimorfismos *CYP2D6*2*, *CYP2D6*9*, *CYP2D6*17*. En la Figura 9A se muestra el producto de amplificación de 360 pb, el cual incluye los polimorfismos en estudio. En la Figura 9B se muestra la restricción del fragmento de 360 pb con las enzimas BspM y MbolI, donde no se aprecian las bandas características del polimorfismo *9 (ver Tabla 4), pero sí de los polimorfismos *2, *17 cuyos patrones de digestión característicos se observan en 32 y 354 pb. Las bandas de peso molecular de interés se presentan en las Tablas 4 y 5.



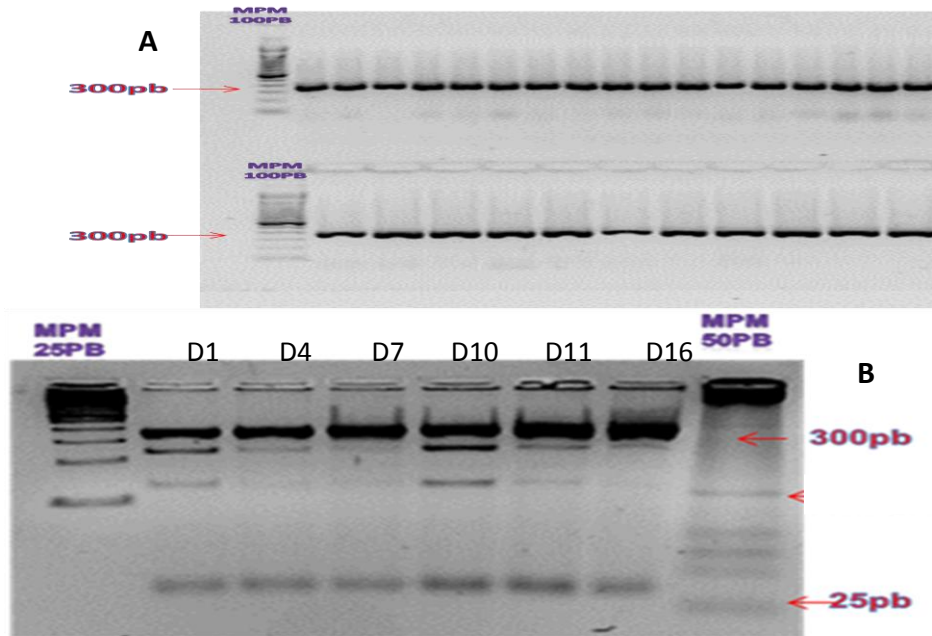


Figura 9. Amplificación y restricción del fragmento de 386pb A) Amplificación del producto de 386 pb que incluye a los polimorfismos CYP2D6*2, CYP2D6*9, CYP2D6*17. B) Ensayo de restricción con BspM y MbolI del fragmento de 386 pb.

Tabla 4. Fragmentos de la digestión de CYP2D6*9

	Fragmento	Patrones de digestión pb
	386	(*9)
wt/wt	-/-	230,124,32
wt/mut	-/del	262, 230,124,32
mut/mut	del/del	262,124

Tabla 5. Fragmentos de la digestión de CYP2D6*2 y CYP2D6*17

	Fragmento	Patrones de digestión pb
	386	(*2,*17)
wt/wt	c/c	230,124,32
wt/mut	c/t	354,230,124,32
mut/mut	t/t	354,32

PCR- Tiempo Real: Los polimorfismos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*9*, *CYP2D6*10* y *CYP2D6*17* se determinaron mediante ensayos de discriminación alélica por PCR en tiempo real.





En la Figura 10 se muestra el plot de amplificación de las sondas 1846 y 4180 de los ensayos realizados. En la Figura 11 se muestra el plot de discriminación alélica de la sonda 4180, la cual detecta el cambio de G/C en la posición 4180.

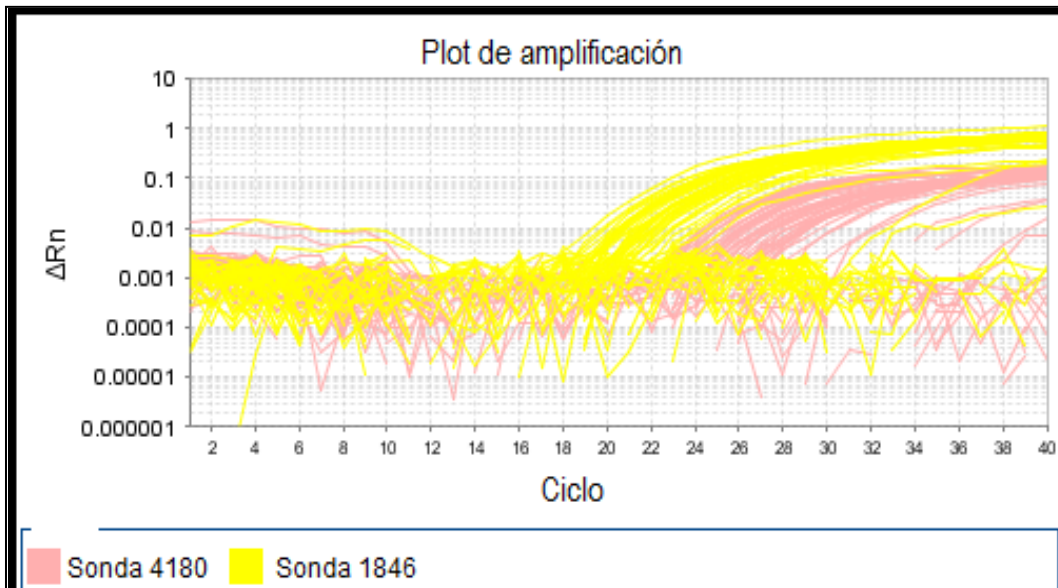


Figura 10. Plot de amplificación para la sondas 1846 y 4180.

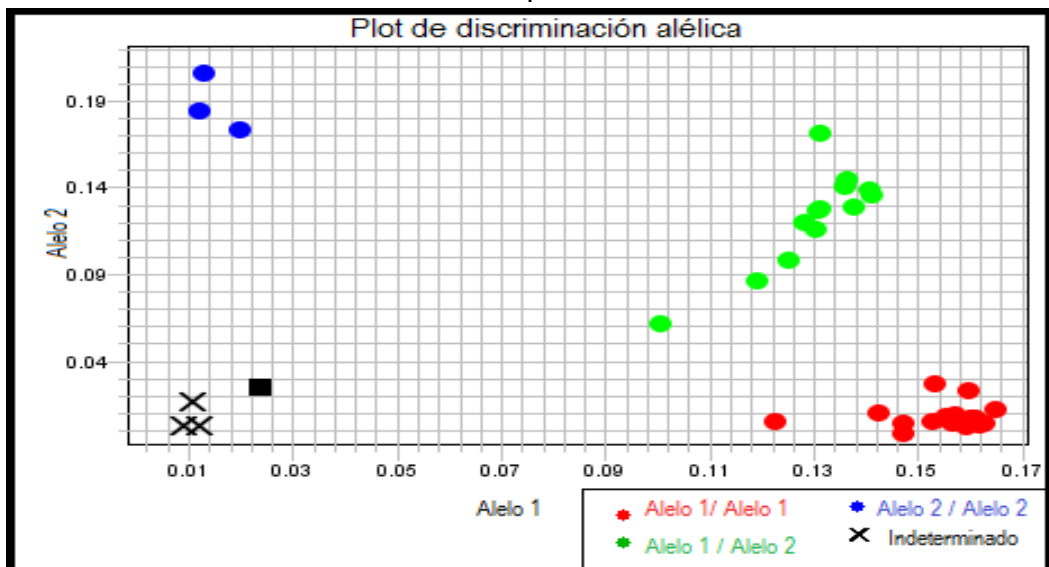


Figura 11. Plot de discriminación alélica de la sonda 4180: en azul se muestran individuos homocigotos C/C, en verde se presentan individuos heterocigotos G/C y en rojo individuos homocigotos G/G (wt).





Con los resultados obtenidos de los ensayos de PCR en tiempo real y PCR-RFLP se asignó el genotipo a cada uno de los individuos. En la Tabla 6 se muestra la forma de asignación, por ejemplo, en el donador D12 se identificó una alteración en ambos alelos en la posición 4180, este cambio está presente en las variantes *2, *4, *10 y *17, primero para confirmar la presencia de los alelos *4 y *10 se determinó el polimorfismo en la posición 100 y después para descartar entre ambos polimorfismos se identificó el cambio de base en la posición 1846 exclusivo de la variante *4. Adicionalmente para descartar entre las variantes *2 y *17 se realizó primero un PCR-RFLP, el cual facilita la detección de ambas variantes en la posición 2850 y después un PCR en tiempo real para discriminar una de las variantes al identificar un cambio más en la posición 1023 exclusiva de la variante *17. Los genotipos *3, *6 y *9 no fueron identificados en este individuo.

Tabla 6. Asignación del genotipo de los individuos

Variedad alélica	Mutación	Individuo			
		D2	D12	D15	D41
*4,*10	100-C/T	wt/wt	wt/mut	wt/mut	wt/wt
*17	1023-C/T	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/mut
*6	1707-DEL T	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt
*4	1846-G/A	wt/wt	wt/mut	wt/wt	wt/wt
*3	2549-DEL A	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/wt
*9	2313-2315 DEL AGA	wt/wt	wt/wt	wt/wt	wt/mut
*2,*17	2850- C/T	wt/wt	wt/mut	wt/wt	wt/wt
*2,*10,*17,*4	4180- G/C	wt/wt	mut/mut	wt/mut	wt/wt
Genotipo asignado		*1/*1	*2/*4	*1/*10	*1/*9

En la Tabla 7 se presenta la frecuencia y el porcentaje de los genotipos encontrados en la población en estudio de acuerdo con los ensayos de PCR en los 41 individuos estudiados





Tabla 7. Frecuencia genotípica identificada en la población de estudio.

Genotipo de <i>CYP2D6</i>	Frecuencia	Porcentaje (n=41)
*1/*1	23	56.1%
*1/*2	13	31.8%
*1/*9	1	2.4%
*1/*10	1	2.4%
*2/*4	3	7.3%

7.2. FASE II. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD, CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS.

En la segunda fase se realizó la evaluación de los efectos; genotóxico y citotóxico (de los cultivos de linfocitos tratados in vitro con anfetamina y metanfetamina (1000 ng/ml), además de la detección de apoptosis. Se seleccionaron 6 individuos; 3 individuos con el genotipo de interés *CYP2D6**2/*4 y 3 individuos con genotipo *CYP2D6**1/*1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado para cada una de las muestras.

7.2.1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR (CITOTOXICIDAD)

El efecto citotóxico se evaluó en cultivos de linfocitos después de 24 y 48 h de tratamiento con anfetaminas, usando como control positivo arsénico a una concentración final de 2.5 μ M. En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos después de 24 h de tratamiento; se puede observar que los linfocitos tratados con anfetamina (89.5%) y metanfetamina (89.4%), mostraron una viabilidad similar a la de los linfocitos sin tratamiento o control negativo (90%).

Los resultados obtenidos a las 48 h de tratamiento se muestran en la Figura 13, de forma similar se observó que el porcentaje de viabilidad del control negativo (83.7%) fue muy parecido al que presentaron los linfocitos tratados con anfetaminas (82%) y metanfetamina (81.5%). Ninguno de los tratamientos evaluados tanto a 24 h como a 48 h mostró diferencias estadísticamente significativas. Cabe mencionar que el control positivo tampoco mostró un efecto citotóxico, lo cual podría deberse a diferencias en la susceptibilidad de los individuos frente a la exposición a arsénico.



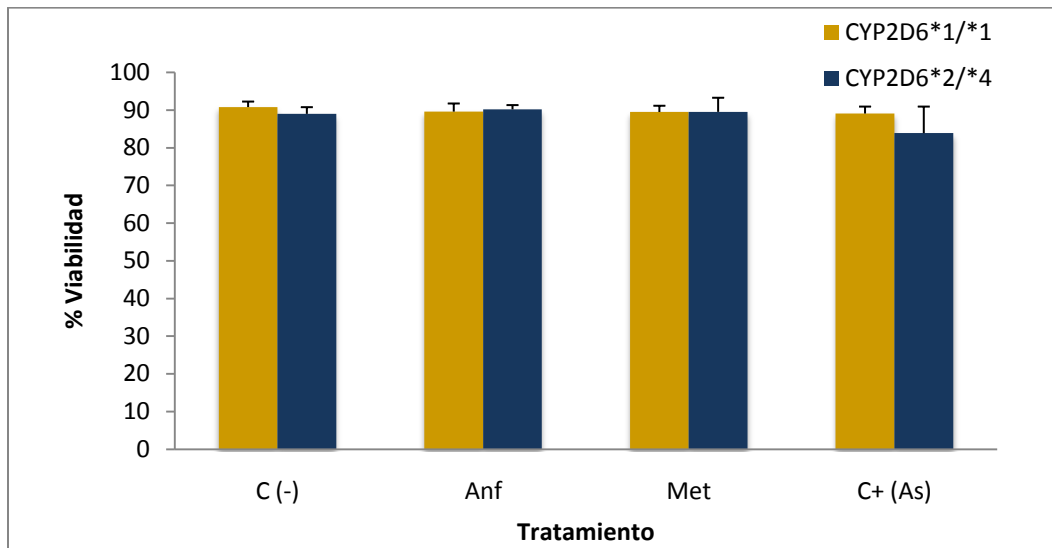


Figura 12. Efecto de las anfetaminas en la viabilidad celular a las 24 h de tratamiento. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes. Se aplico una ANOVA con comparación múltiple de Tukey (*p < 0.05).

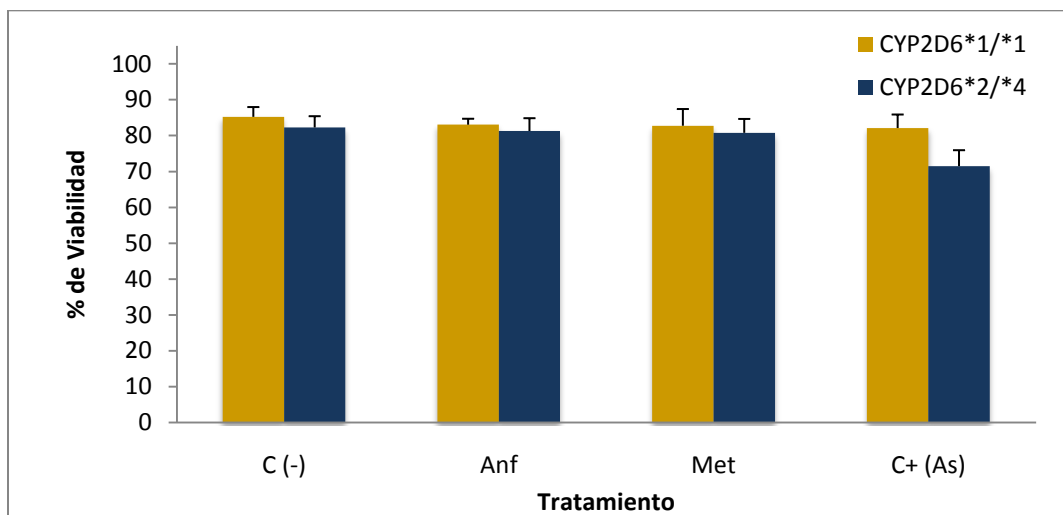


Figura 13. Efecto de las anfetaminas en la viabilidad celular a las 48h de tratamiento. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes. Se aplico una ANOVA con comparación múltiple de Tukey (*p < 0.05).





7.2.2. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR (CITOSTATICIDAD).

El efecto citostático de las anfetaminas se evaluó mediante el uso de la técnica de bloqueo de la citocinesis con citocalasina B ²⁷. Para ello se analizó el porcentaje de células que pasaron por una o más divisiones y se determinó el índice de proliferación nuclear (IPN). Los resultados mostraron que el IPN fue similar entre los linfocitos sin tratamiento (1.712) y los linfocitos tratados con los compuestos de anfetamina (1.657) y metanfetamina (1.666). Por lo tanto, estos resultados indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con anfetamina, metanfetamina y arsénico (Figura 14).

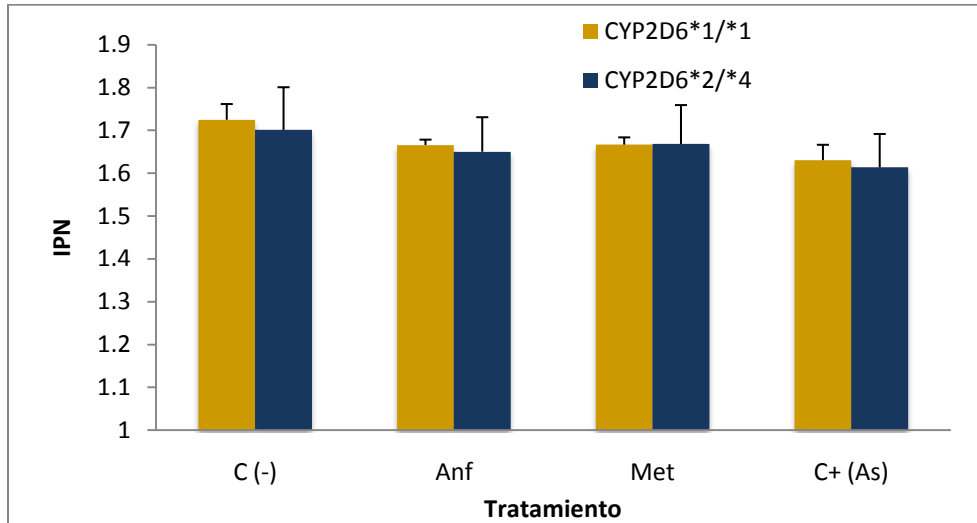


Figura 14. Efecto de las anfetaminas sobre la proliferación celular. Se realizó una ANOVA con comparación múltiple de Tukey (* p < 0.05).

7.2.3. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD POR LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

La genotoxicidad de las anfetaminas se evaluó mediante la técnica de micronúcleos basada en el bloqueo de la citocinesis²⁷ en cultivos de linfocitos expuestos a anfetamina y metanfetamina (1000 ng/ml respectivamente).





En la Figura 15 se presenta la frecuencia de MN en los individuos estudiados. Los resultados indicaron que hubo un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos de individuos con el genotipo *2/*4 (inactivo) tratados con anfetamina y metanfetamina, respecto a los linfocitos no tratados.

Al comparar los dos genotipos (activo vs inactivo) se observó un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los individuos con el genotipo *2/*4 tratados con anfetamina (4 MN) y metanfetamina (4.3 MN). Mientras que la frecuencia de MN en los individuos con el genotipo *1/*1 fue de 1.2 MN con anfetamina y de 1.5 MN con metanfetamina. En cuanto a los linfocitos tratados con arsénico (un agente genotóxico conocido), se encontró un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos (5.4 MN) con respecto al control negativo (1 MN).

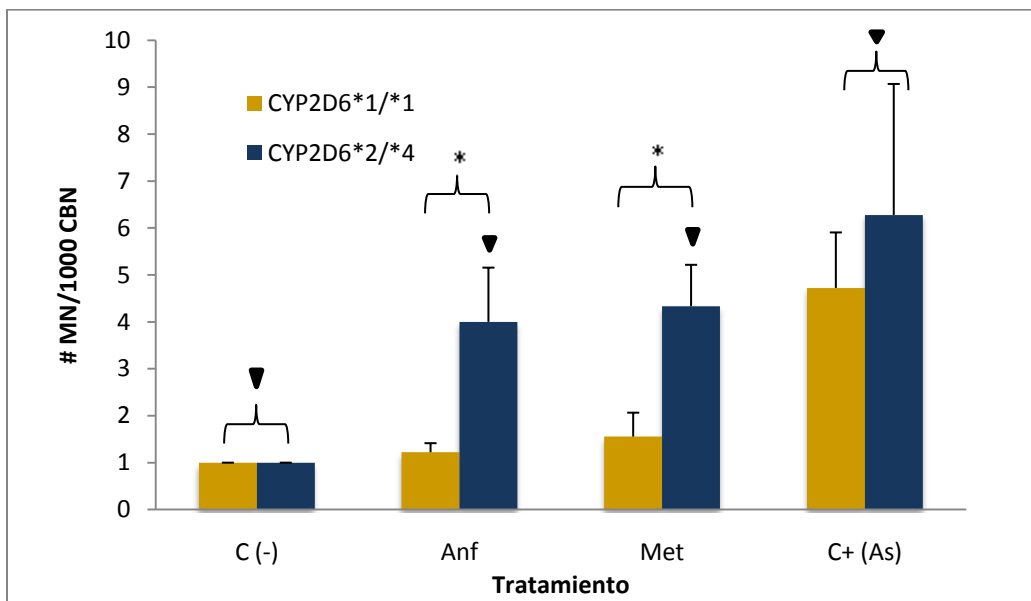


Figura 15. Evaluación del efecto genotóxico de los linfocitos tratados con anfetamina y metanfetamina. Se ajustaron los datos asignando en valor numérico de 1 al C(-). Se realizó una ANOVA con comparación múltiple de Tukey (▼ $p < 0.05$ con respecto al C(-), * $p < 0.05$ con respecto al tratamiento).





7.2.4. EVALUACION DE LA INDUCCION DE APOPTOSIS

La inducción de apoptosis se evaluó mediante un ensayo con Anexina V. En la tabla 8 se presentan los porcentajes de apoptosis (temprana, tardía y total) a las 48 h de tratamiento con anfetamina y metanfetamina.

El porcentaje de inducción de apoptosis temprana fue entre 0.91 y 1.66, y en este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los tratamientos aplicados.

En lo que respecta a la apoptosis tardía, los linfocitos de los individuos con el genotipo *2/*4 (inactivo) que fueron tratados con el compuesto de metanfetamina tuvieron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de apoptosis, con respecto a los individuos con el genotipo *1/*1 (activo) (Tabla 8). El efecto de los compuestos estudiados en la inducción de apoptosis total se presenta en la Figura 16.

Los linfocitos de los individuos con genotipo *2/*4 tratados con anfetamina y metanfetamina mostraron una tendencia a incrementar el porcentaje de apoptosis. Sin embargo, este incremento solo fue estadísticamente significativo para el tratamiento con metanfetamina cuando se compararon los individuos con el genotipo *1/*1 (1.63%) vs *2/*4 (3.34%).

Tabla 8. Efecto de las anfetaminas en la inducción de apoptosis.

Tiempo de Exposición	Tratamiento	Genotipo de CYP2D6	% de Apoptosis Temprana	p < 0.05	% de Apoptosis Tardía	p < 0.05	% de Apoptosis Total	p < 0.05
48H	Anfetamina	*1/*1	0.93±0.07	X	0.99±0.23	X	1.92±0.24	X
		*2/*4	1.05±0.25	X	1.42±0.28	X	2.47±0.41	X
	Metanfetamina	*1/*1	0.91±0.26	X	0.72±0.40	√	1.63±0.57	√
		*2/*4	1.66±0.45	X	1.67±0.41	√	3.33±0.26	√

√: Efecto estadísticamente significativo X: Sin significancia estadística



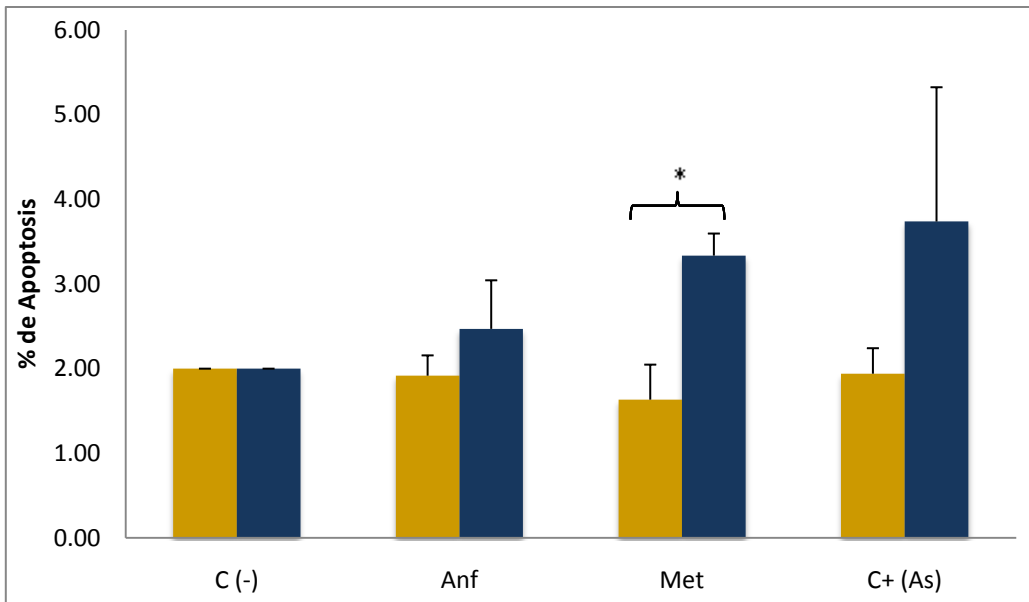


Figura 16. Efecto de las anfetaminas sobre la inducción de apoptosis total en linfocitos. Se aplicó la prueba estadística Kruskal-Wallis (* $p < 0.05$).





8. DISCUSIÓN

En nuestro país, el consumo de sustancias de abuso está en aumento, produciendo efectos negativos en la salud y en la sociedad. Entre las drogas de mayor consumo se encuentran las anfetaminas.

Este trabajo se enfocó a la evaluación del efecto genotóxico producido por las dos anfetaminas de mayor uso (anfetamina y metanfetamina) y su relación con los polimorfismos genéticos de la principal enzima (CYP2D6) encargada de su metabolismo.

Por lo menos cinco variantes alélicas de esta enzima han demostrado tener consecuencias en su función, por ejemplo tanto *CYP2D6*3* como *CYP2D6*4* producen una enzima inactiva, mientras que la variante *CYP2D6*10* origina una enzima inestable, *CYP2D6*17* presenta afinidad reducida por los sustratos, mientras que *CYP2D6*2xN* conduce a una actividad enzimática alta^{12, 33}.

En un estudio realizado en 2005 en población Mestizo Mexicana con 243 voluntarios se reportaron los siguientes genotipos *CYP2D6*1/*2* (15.23%), *CYP2D6*2/*4* (7.82%) y *CYP2D6*1/*10* (12.35%), mientras que el genotipo *CYP2D6*1/*17* no fue identificado³⁴. En nuestro estudio se observan diferencias con respecto a las frecuencias previamente reportadas³¹. En la Tabla 7 se muestran las frecuencias y los porcentajes de los genotipos estudiados en nuestra población. Cabe señalar que las diferencias observadas podrían deberse al tamaño de nuestra población (n=43). Sin embargo, la variante alélica de interés en nuestro estudio (**2/*4*), presenta una frecuencia similar a la reportada en el estudio de López y colaboradores.

Por otra parte, se ha propuesto que cuando se administran fármacos, los individuos que tienen alguna de las variantes alélicas funcionalmente inactivas podrían tener mayor riesgo de presentar efectos adversos y tóxicos, esto debido a que los fármacos permanecen mayor tiempo en circulación al no ser metabolizados y eliminados¹⁴.





Es importante mencionar que en este estudio se seleccionó una dosis no citotóxica, ya que para evaluar la genotoxicidad se requiere que la dosis utilizada no produzca un efecto altamente citotóxico. Nuestros resultados muestran que con los tratamientos con anfetamina y metanfetamina (1000 ng/ml) no hay diferencias significativas en cuanto al efecto citotóxico. Tampoco se observó un efecto significativo en la viabilidad de las células en relación al genotipo *2/*4. Estos resultados concuerdan con datos previos en donde se realizó una curva dosis-respuesta (500-2500 ng/ml), mostrando que no hay un efecto citotóxico en linfocitos tratados con 500 y 1000 ng/ml de anfetamina y metanfetamina^{2,35}. De igual manera, no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular, lo que resulta concordante con el hecho que la dosis aplicada es considerada no tóxica^{2,36}.

Existen escasos estudios con respecto a la citotoxicidad de las anfetaminas y su relación con el genotipo de *CYP2D6*. En la literatura solo se encuentra un trabajo realizado por Carmo y colaboradores que reporta la citotoxicidad de un derivado de la anfetamina el MDMA o “Éxtasis” (*3,4-metilenodioximetanfetamina*), y la influencia que tiene *CYP2D6* en esta. En una línea celular de fibroblastos (V79) transfectada para expresar las variedades alélicas de *CYP2D6* *1, *2, *9, *10 y *17, se evaluó el efecto citotóxico mediante un ensayo clonogénico³⁷. Los datos de dicho estudio muestran que la variante alélica funcional de *CYP2D6* (*1/*1) tiene un mayor efecto citotóxico en comparación con los controles y con las otras variantes evaluadas. Carmo y colaboradores proponen que este efecto se debe a la formación de metabolitos producidos por la oxidación del éxtasis³⁷.

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con ambas anfetaminas, al comparar la frecuencia de MN en los individuos con el genotipo *1/*1 contra los que presentan el genotipo *2/*4 (inactivo), donde se observó un aumento en la frecuencia de MN de los individuos con polimorfismo *2/*4 con ambos tratamientos. También se puede observar que la metanfetamina es ligeramente más genotóxica que la anfetamina.





Se ha reportado que la metanfetamina aumenta la frecuencia de micronúcleos en células CHO-K, en un estudio que se llevó a cabo en presencia de S9 para corroborar que la genotoxicidad fue causada por la metanfetamina, y no por sus metabolitos³⁸. Sin embargo, en dicho estudio no se considera la influencia del metabolismo de la metanfetamina.

Existe controversia con respecto al efecto genotóxico de las anfetaminas y sus derivados. Por un lado, El-Zein y colaboradores reportan daño citogenético (aberraciones cromosómicas) en linfocitos de 12 niños con TDAH tratados con metilfenidato, el cual es un análogo de la anfetamina. En dicho trabajo se reporta un aumento en la frecuencia de micronúcleos (2.4 veces), intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas después de 3 meses de tratamiento (20-54 mg/día)³⁹. Por otra parte, Witt y colaboradores, no encontraron un efecto genotóxico al evaluar la frecuencia de MN y aberraciones cromosómicas en 47 niños con TDAH, de los cuales 25 fueron tratados con metilfenidato y 22 con sales mixtas de anfetamina⁴⁰. En ambos estudios se observó una gran variabilidad entre los individuos. Esta variabilidad individual podría explicar los hallazgos encontrados en los estudios publicados^{39,40}. Además, en dichas investigaciones no se estudió la influencia de la presencia de polimorfismos genéticos de las enzimas que se encargan de su metabolismo. En este contexto, es probable que el metabolismo pueda afectar el nivel de daño genético en los individuos expuestos a estos compuestos. Entre los mecanismos que podrían explicar la generación de daño por las anfetaminas, se podría atribuir a su capacidad para inducir un exceso de dopamina, lo cual se asocia con la producción de radicales hidroxilo y superóxido los cuales pueden participar en los efectos tóxicos de las anfetaminas a través de la oxidación de proteínas y daño al DNA⁴¹.

En relación a la apoptosis, los hallazgos muestran que el Éxtasis, tiene capacidad para inducir apoptosis. En dicho estudio se evaluó el efecto pro-apoptótico en hepatocitos de rata y en la línea celular HSC, encontrándose alteraciones morfológicas y bioquímicas comúnmente asociadas a apoptosis⁴².





En nuestro estudio mediante el uso de la técnica de Anexina V, en los individuos con el genotipo inactivo, se observó una tendencia a aumentar la muerte programada, sin embargo, este incremento solo mostró diferencias estadísticamente significativas a las 48 h con metanfetamina.

En un estudio realizado en 2004 se encontró evidencia que la metanfetamina induce muerte celular producida como consecuencia de las interacciones entre el retículo endoplasmático (estresado) y las vías mitocondriales muerte, mostrando un aumento en la expresión de GRP78/BiP y CHOP y demostrando la transición de AIF, smac/DIABLO, y el citocromo c mitocondriales en fracciones citoplasmáticas⁴³.

Los hallazgos encontrados en el presente trabajo muestran evidencias importantes de la participación del metabolismo de las anfetaminas en la susceptibilidad al daño genotóxico. De ahí que se encontró que los individuos con el genotipo *2/*4 (inactivo) presentan incremento en la frecuencia de micronúcleos en comparación con los individuos con el genotipo funcional (*1/*1). Además, nuestros resultados muestran que se induce apoptosis, lo que podría sugerir que los mecanismos de protección de la célula son activados para evitar que trascienda el daño al DNA producido por las anfetaminas. En otro escenario, sería interesante considerar que los consumidores crónicos (por lo general con un estado de salud deteriorado), serían individuos susceptibles a tener más daño genotóxico, probablemente debido a la presencia de variantes no funcionales de la enzima y a la deficiencia de los mecanismos que salvaguardan la integridad del DNA.





9. CONCLUSIONES

- En la población de estudio, la distribución de genotipos para la enzima CYP2D6 fue: 56.1% para *CYP2D6**1/*1, 31.8 % para *CYP2D6**1/*2, 7.3% para *CYP2D6**2/*4, 2.4% para *CYP2D6**1/*9 y 2.4% *CYP2D6**1/*10.
- Ninguna de las dos anfetaminas utilizadas en este estudio inducen un efecto citotóxico o afectan la proliferación celular con la concentración evaluada (1000 ng/ml).
- El tratamiento con metanfetamina indujo un aumento en la muerte celular programada (apoptosis) en los linfocitos de individuos con genotipo inactivo de *CYP2D6* (*2/*4).
- La anfetamina y la metanfetamina aumentaron la frecuencia de micronúcleos en los individuos que presentan el genotipo inactivo de la enzima (*CYP2D6**2/*4).





10. PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de muestra (n) para identificar y estudiar más donadores con los polimorfismos de interés.
- Determinar polimorfismos genéticos con actividad metabólica reducida (*CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* o *CYP2D6*9*) y analizar su relación con el daño genotóxico producido por las anfetaminas.
- Evaluar el efecto genotóxico en individuos medicados con otros fármacos que son metabolizados por CYP2D6 (antidepresivos, antipsicóticos y antiarrítmicos) y correlacionar este efecto con sus polimorfismos genéticos.





11. BIBLIOGRAFIA

1. Haile C, Kosten T, Kosten T. Pharmacogenetic Treatments for Drug Addiction. *Drug Alcohol Abuse* 2009. 35(3): 161–177.
2. Miranda E. “Susceptibilidad individual a los efectos de las anfetaminas y su posible relación con los polimorfismos de CYP2D6” tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM 2008.
3. Encuesta Nacional de Adicciones, Secretaria de Salud 2008.
4. Rang H, Dale M, Ritter J. *Farmacología*, 6ª ed. Elsevier, Barcelona España 2008. 183, 184, 610-615.
5. Howland R, Mycek M. *Pharmacology*, 3ª ed. Howland Mycek, USA 2006. 119-121.
6. Kreth K, Kovar K, Schwab M and Zanger U. Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism “ecstasy” related desingner drugs. *Pharmacology* 2000. 59:1563.
7. Law M, Slawson M. Selective Involvement of cytochrome P450 2D subfamily in vivo 4-hidroxylation of amphetamine in rat. *Drug Metabolism and Disposition* 2000. 28(3):348.
8. Cruickshank C and Dyer K R. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 2009. 104: 1085–1099.
9. Weisler R, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Faraone S, Chrisman A, Read S, Tulloch S. Mixed Amphetamine Salts Extended-Release in the Treatment of Adult ADHD: Randomized, Controlled Trial. *CNS Spectrums* 2006. 11(8):625-39.
10. Berman S, O’Neill J, Fears S, Bartzokis G, London E. Abuse of Amphetamines and Structural Abnormalities in Brain. *Addiction Reviews* 2008. 11(4):195-220
11. Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel H, Krieg H, Vedder H. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *The FASEB Journal* 1999. 13: 1065-1072.





12. Higgins M, Stearns V. CYP2D6 Polymorphisms and Tamoxifen Metabolism: Clinical Relevance, *Current Oncology Reports* 2010. 12:7–15.
13. Chu V, Einolf H, Evers R, Kumar G, Moore D, Ripp S, Silva J, Sinha V, Sinz M, Skerjanec A. In Vitro and in Vivo Induction of Cytochrome P450: A Survey of the Current Practices and Recommendations: A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Perspective. *Drug Metab Disposition* 2009. 37(7):1339-54.
14. Foley K, Quigley D. Pharmacogenomic potential of psychiatric medications and CYP2D6. *Medical Laboratory Observer* 2010. 42(1):32-4.
15. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism* 2008. 5:27.
16. Hart S, Wang S, Nakamoto K, Wesselman C, Li Y, Zhong X. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008. 18:11–24.
17. Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D and Sonawane B. Genetic Polymorphism in Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population Distribution of CYP2D6 Activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2009. 12: 5, 334 - 361.
18. Ingelman-Sundberg. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences evolutionary aspects and functional diversity *The Pharmacogenomics Journal* 2005. 5, 6–13.
19. Aardema M and MacGregor J. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “omics” technologies. *Mutation Research* 2002. 499:13–25.
20. Rusyn I, Gatti D, Wilshire T, Kleeberger S, Threadgill D. Toxicogenetics: population-based testing of drug and chemical safety in mouse models. *Pharmacogenomics* 2010. 11(8): 1127–1136.
21. Strachan T, Read A. *Genetica Humana*. 3^a ed, Mc Graw-Hill Interamerica, Mexico 2006. 316-318.





22. Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Carroll S. *Genética*, 9^a ed. Mc Graw Hill, España 2008. 513-526.
23. Pierce B. *Genética un foque conceptual*. 3^a ed. Editorial Medica Panamericana, España 2009. 472-497.
24. Pfuhler S, Kirkland D, Kasper P, Hayashi M, Vanparys P, Carmichael P, Dertinger S, Eastmond D, Elhajouji A, Krul C, Rothfuss A, Schoening G, Smith A, Speit G, Claire T, Benthem J, Corvi R. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. *Mutation Research* 2009. 680; 31–42.
25. Benassi B, LeLeu R, Bird T, Clifton P, Fenech F. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assays for the Determination of Genotoxicity and Cytotoxicity of Cecal Water in Rats and Fecal Water in Humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2007.16(12).
26. Norppa H, C.M.Falck G. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003. 18: 221–233.
27. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007. 2:5 1084-1104.
28. Jimenez L, Merchant H. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación, Mexico D.f 2003. 595,596.
29. Evan G, Vousden K. Proliferation, cell and apoptosis in cancer. *Nature* 2001. 411:342-348.
30. Abbas A, Lichtman A, Pillai S: *Inmunología celular y molecular*. 6^{ta} ed. ElSevier, Saunders 2008. 255-257.
31. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 2006. 1:1458-1461.
32. Fenech M, Chang W, Kirsch V, Holland N, Bonassi S, and Zeiger E. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 2003. 534: 65-75.





33. Abraham k, Adithan C. Genetic polymorphism of *CYP2D6*. Indian Journal of Pharmacology 2001. 33: 147-169
34. López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. *CYP2D6* genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. European Journal of Clinical Pharmacology 2005. 61(10):749-54.
35. Suárez H. Efecto genotóxico y citotóxico de la anfetamina y la metanfetamina en cultivos de linfocitos humanos. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biológico. Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana 2005.
36. Gagnon L, Lacroix F, Chan J, Buttar H. Invitro effects of designer amphetamines on human peripheral blood mononuclear leukocytes proliferation and natural killer cell activity. Toxicol let 1992. 63:313-319.
37. Carmo H, Brulport M, Hermes M, Oesch F, Silva R, Ferreira L, Branco P, Boer D, Remiao F, Carvalho F, Schon M, Krebsfaenger, Doehmer J, Bastos M, Hengstler J. Influence of *CYP2D6* polymorphism on 3,4 methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) cytotoxicity. Pharmacogenetics and Genomics 2006. 16:789–799.
38. Jih H, Heng C, Wei B, Shih K. Genetic toxicity of methamphetamine in vitro and in human abusers. Environmental and Molecular Mutagenesis 2003. 42:233-243.
39. El-Zein R, Rahman S, Hay M, Lopez M, Bondy M, Morris Db, Legator M. Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. Cancer Letters XX 2005. 1-8.
40. Witt K, Shelby M, Itchon N, Faircloth M, Kissling G, Chrisman A, Ravi H, Murli H, Mattison D, Kollins S. Methylphenidate and amphetamine do not induce cytogenetic damage in lymphocytes of children with ADHD. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 2008. 47(12):1375-83.





41. Krasnova I, Ladenheim B, and Cadet J. Amphetamine induces apoptosis of medium spiny striatal projection neurons via the mitochondria-dependent pathway. *The FASEB Journal* 2005. 19(7):851-3.
42. Montiel C, Varela M, Osés J, López M, Beitia G, Cenarruzabeitia E, Iraburu M. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochimica et Biophysica* 2002, 1588; 26-32.
43. Jayanthi S, Deng X, Pierre A, Landheim N, Cadet J. Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria dependent death cascades. *The FASEB Journal* 2004. 18: 238-251.

