



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ANALISIS DE LA FRECUENCIA ALELICA 1, 2, 4 Y 10 DE CYP2D6 EN UNA POBLACION DE LA CIUDAD DE MEXICO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JESUS ALEJANDRO AGUILAR HERNANDEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARIA SALAZAR MARTINEZ

FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m. 347 284



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de la frecuencia alélica 1, 2, 4 y 10 de CYP2D6 en una población de la ciudad de México".

realizado por Jesús Alejandro Aguilar Hernández

con número de cuenta 09103335-0, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director
Propietario Dra. Ana María Salazar Martínez

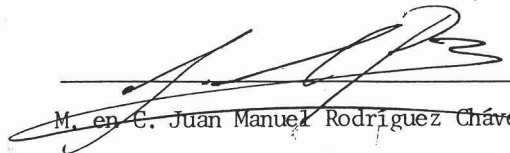
Propietario M. en C. Elias Miranda González

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Suplente Dr. Emilio Rojas del Castillo

Consejo Departamental de Biología


M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al jurado por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Dra. Ana María Salazar Martínez
M. en C. Elías Miranda González
Dr. Felipe Jiménez García
Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dr. Emilio Rojas del Castillo

A la **Dra. Patricia Ostrosky**, por todas las oportunidades para trabajar en su laboratorio, enseñanzas y el buen término de este trabajo, pero sobre todo por brindarme su apoyo en los tiempos difíciles.

A la **Dra. Ana María Salazar**, por sus enseñanzas, paciencia, la dirección en este trabajo y su gran ayuda ya que sin su apoyo este trabajo no existiría.

A la **Q.F.B. Monserrat Sordo** por su apoyo, enseñanza y asesoría en las técnicas experimentales.

A la **Dra. Julieta Rubio** y la **Dra. Clementina Castro**, por su apoyo en la obtención de muestras del BANCO DE ADN, del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Así como las Muestras empleadas de M.C. Andrés Bendesky.

A la **M. en C. Martha Sosa** por su apoyo en la obtención de información sobre el estado de Durango.

A la **M en C. Aurora Elizabeth y M en C. María Eugenia** por su apoyo en el área estadística.

A la **Dra. Guadalupe Barajas y al Biol. Armando López**, por sus enseñanzas y asesorías en el área de genética de poblaciones

Al **MIIB Luis Rosales** por su apoyo en el área de Bioinformática.

A todos los donadores por su participación que nos permitió realizar este estudio

La realización de este trabajo estuvo apoyado por los Proyectos: **PAPIIT-DGAPA IN204502** y **CONACYT 40291-M**
El sustentante fue becario de CONACYT.

EN MEMORIA

**Ma. Elvia Hernández Palos
(1945 – 2003)**

¡ USTED PUEDE !



A mi Padre, mil gracias por todo, por ser un ejemplo de superación en mi vida e iniciarme en el mundo del silicio, te dedico esta tesis con todo mi cariño, respeto y admiración.

A Mis Hermanas Elvia, Liliana y Vero, mis sobrinos Paola y Fernando gracias por todo el cariño, atención, enseñanzas, regaños y tantos momentos que han complementado toda mi vida.

A Ana Laura, hija en ocasiones hay que subirse en los hombros de los demás para poder ver más allá y mostrar el camino a los que vienen, nunca dejes de imaginar.

Aline gracias, por tu tiempo, tu compañía, tu cariño y tu atención que han enriquecido mi vida y ser una luz en esos momentos tan amargos.

Edith que te puedo decir... mil gracias por todo.

A toda la gente del laboratorio: Fatima, Elizabeth, Doris, Laura, Gladis, Maru, Sra. Martita, Olivia, Andrea, Andres, por su amistad, su ayuda, su tiempo, su espacio y sus enseñanzas.

Lucia, Wendy, Polo, Roberto, Marcos, Rubén, Laura, Gustavo, Silvia, Violeta y todas las personas especiales para mí que me han dado su amistad, apoyo y atención.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, FACULTAD DE CIENCIAS por darme la oportunidad de aprender y usar sus instalaciones para mi crecer académico y profesional.

A ti que sostienes esta tesis y me permites continuar el reconocimiento a toda esta gente maravillosa, que de alguna forma participo en el desarrollo de la misma.

“Conocer el genoma humano es solo la punta del iceberg. Aun si se pudiera conocer la función de los 30 mil genes humanos, no se tendría todavía la información para saber cuales son las proteínas que se fabrican en un tejido y cuales en otro”

Alberto Kornblihtt

INDICE

Introducción	2
1. Citocromo P450 (EC.1.14.14.1)	3
1.1 Función	5
1.2 Estructura	6
1.2.1 Estructura tipo: P450cam de <i>Pseudomonas putida</i>	8
1.3 Sustrato	11
2. Filogenia de CYP450	12
2.1 Familia CYP2	12
2.2 CYP2D6	13
2.2.1 Estructura de CYP2D6	14
2.2.2 Sustrato	18
2.2.3 Polimorfismos de CYP2D6	19
3. Estructura de la Población Mexicana	22
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
Método	27
Resultados	30
Discusión	40
Conclusiones	44
Bibliografía	45

Introducción

Los organismos se exponen continuamente a una gran variedad de compuestos químicos externos o xenobióticos, los cuales pueden tener un origen natural o antropogénico. En general se tratan de compuestos hidrofóbicos los cuales se absorben rápidamente a través de la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal; sin embargo, la exposición constante o intermitente a estos compuestos sin una vía principal de eliminación puede resultar en su acumulación, por lo cual los organismos han desarrollado procesos bioquímicos, donde intervienen una gran cantidad de enzimas que modifican la estructura química de los xenobióticos, convirtiéndolos en metabolitos más hidrofílicos, facilitando de esta forma su excreción¹.

En conjunto estos procesos se conocen como biotransformación (Figura 1); las reacciones implicadas se dividen en: Fase I la cual involucra a la oxidación, la reducción y la hidrólisis; y la Fase II constituida por la conjugación, aunque algunos compuestos pueden requerir las dos vías para su biotransformación. Las reacciones de Fase I son producidas por dos sistemas de oxidación enzimática: el Citocromo P450 y la función combinada de aminas oxidasas como la flavin-oxigenasa¹.

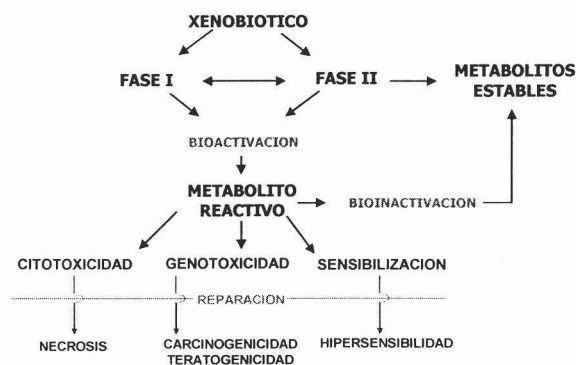


Figura 1. La biotransformación de Xenobióticos y posibles efectos adversos. Basado en Lares-Asseff (2001)².

1. Citocromo P450 (EC.1.14.14.1)

En el año de 1958, los investigadores Garfinkel y Klingenberg reportaron la existencia de un cromóforo celular, el cual al reaccionar con el monóxido de carbono, presentaba un pico máximo de absorción a la longitud de onda de 450 nm, por lo cual recibió el nombre de Citocromo P450 (CYP)³, pero fue hasta mediados de los años 60s cuando se comenzó a asociar con el metabolismo de esteroides y de otros químicos⁴.

Para 1970 ya se especulaba la existencia de seis enzimas de la familia de los CYPs, sin embargo, González y colaboradores en 1980 mediante la purificación del ARNm, lograron aislar el primer ADNc que codificaba para un CYP y con esto se logró identificar una variedad de enzimas semejantes. Cuando se comparó la secuencia de nucleótidos entre humanos y bacterias se encontró una gran similitud, no obstante, en las especies más primitivas no se encontraron formas de esta enzima, por lo cual se sugirió que con las bacterias y los humanos comparten un ancestro común ubicado alrededor de los 3 000 millones de años. En la actualidad se han descubierto cerca de 285 genes y pseudogenes diferentes de CYP⁴, los cuales se pueden consultar en la siguiente página:

<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>⁵

Al describirse las enzimas que formaban parte de esta superfamilia, se adoptaron múltiples nombres y clasificaciones para las mismas enzimas, por lo cual fue necesario crear una nueva nomenclatura que se basó en la evolución divergente de esta superfamilia. Esta nomenclatura organiza a las familias y las subfamilias dependiendo del porcentaje de identidad de sus secuencias, siendo agrupadas en familias a aquellas enzimas que comparten un 40% de identidad y que son denominadas por un número arábigo. Mientras que las enzimas con más de un 55% de identidad constituyen a las subfamilias designadas por una letra⁴, algunos ejemplos de las familias de CYPs se pueden observar en el cuadro 1.

Familia	Número de Subfamilias	Número de Genes
CYP1	2	3
CYP2	13	16
CYP3	1	4
CYP4	5	12
CYP5	1	1
CYP7	2	2
CYP8	2	2
CYP11	2	3
CYP17	1	1
CYP19	1	1
CYP20	1	1
CYP21	1	1
CYP24	1	1
CYP26	3	3
CYP27	3	3
CYP39	1	1
CYP46	1	1
CYP51	1	1

Cuadro 1. Familia de genes humanos de CYP³.

Con los avances en el área de la biología molecular y de la genómica se han caracterizado individualmente a diversos miembros de esta superfamilia de enzimas de CYPs, encontrando diferencias puntuales en sus secuencias que les infieren diferentes actividades metabólicas⁴. Por lo cual se generó una base de datos donde los alelos son identificados por un asterisco seguido de un número arábigo que lo identifica⁶. En esta base se agrupan todas las variedades reportadas de CYP, las cuales se pueden consultar en la página electrónica:

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>⁶

1.1 Función.

Las enzimas de la superfamilia de CYPs, son inducidas por una gran variedad de compuestos químicos tanto endógenos como exógenos (incluyendo a los fármacos que actualmente se prescriben); se sabe que la mayoría de estos compuestos son liposolubles; por lo cual estas enzimas se auxilian de otras enzimas como oxidasas o peroxidasas, para introducir un grupo funcional al sustrato lipofílico y hacerlo más hidrosoluble facilitando su metabolismo o su excreción; sin embargo, el metabolismo de algunos xenobióticos como drogas, químicos ambientales, contaminantes o los productos de las plantas, pueden producir metabolitos tóxicos que contribuyen a incrementar el riesgo de cáncer⁴.

Las familias del CYP encargadas de metabolizar los xenobióticos son exclusivamente CYP1, CYP2, CYP3 y en menor grado CYP4, cuyos miembros más estudiados son CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6 y CYP2B6, los cuales están implicados en el metabolismo de fármacos, de tal forma que son responsables de la falta de eficacia y de algunos efectos colaterales en los tratamientos médicos, como es el caso de las enzimas CYP2C19 y CYP2D6 las cuales presentan polimorfismos generando diferencias en la actividad metabólica de ciertos fármacos en diferentes poblaciones humanas. Otras enzimas como CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 y CYP3A5 se han asociado con el incremento de riesgo de cáncer o de efectos tóxicos que pueden llevar a la muerte⁴.

Las reacciones adversas a los medicamentos afectan el tratamiento del paciente, el desarrollo de nuevos fármacos e implican un alto costo económico. En Estados Unidos se ha estimado que los efectos adversos tienen un costo de alrededor de 100 mil millones de dólares y son la causa de más de 100,000 muertes anuales; en Inglaterra se considera que un 7% de las admisiones hospitalarias son producidas por las reacciones adversas y un 13% de las admisiones en clínicas de medicina interna en Suiza.⁷ En México, no se han

reportado estadísticas confiables que permitan valorar el impacto socio-económico de esta problemática.

1.2 Estructura

Las enzimas de esta superfamilia poseen entre 400 a 530 residuos de aminoácidos, en su estructura contiene un grupo Hemo (Protoporfirina IX), ligado a un residuo de cisteína que se conserva en toda la familia⁸, las regiones cercanas de la secuencia son consideradas como una firma, la cual podemos observar en la siguiente secuencia de residuos de aminoácidos:



donde **+** es arginina, histidina, prolina o treonina, mientras que **X** es cualquier residuo de aminoácido⁹.

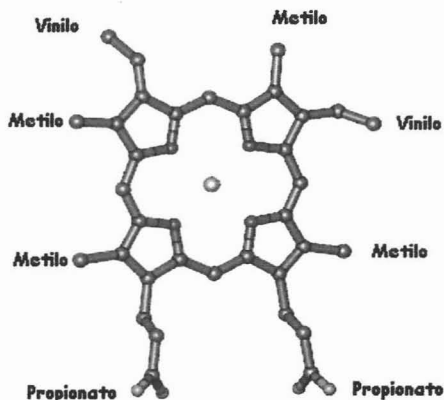


Figura 2. Estructura del Grupo Hemo, imagen obtenida con Ribbons 3.0¹⁰.

El grupo hemo juega un papel importante en la activación del oxígeno molecular, de tal forma que en ausencia del sustrato, el átomo de Hierro (Fe^{III}) es coordinado a través de un enlace tiol con la cisteína de la proteína y de un enlace covalente con el agua, formando un hidróxido; cuando el sustrato está presente las moléculas de agua son desplazadas del sitio activo por el sustrato y el átomo de Hierro cambia de un estado III a II lo que reduce la polaridad del ambiente hemo, favoreciendo la reducción del sustrato, sin embargo, en otras enzimas de CYPs, el sustrato no es accesible al grupo hemo por lo cual algunas moléculas de agua intervienen en este proceso para comunicar el grupo hemo con la superficie y el sustrato⁹.

Utilizando las metodologías de mutagénesis dirigida, de modificación de residuos de aminoácidos y de la formación de enlaces covalentes en las secuencias, se ha establecido la relevancia de ciertos residuos de aminoácidos para la unión del sustrato o su reconocimiento. Así, se han determinado los sitios activos o regiones claves consideradas como sitios de reconocimiento del sustrato (SRS), los cuales juegan un papel muy importante en la interacción con el sitio de anclaje a la membrana, los sustratos redox, tales como el grupo hemo, la unión con el oxígeno y su activación³.

Algunas de las enzimas de la familia de CYPs presentan diversos polimorfismos, por lo que al conocer su estructura, se puede predecir su función y con esto considerar si un nuevo fármaco puede ser un sustrato ideal o no para estas enzimas, además de reducir con esto la falta de eficiencia en ciertos tratamientos farmacológicos. De ahí que el modelar por homología las secuencias de los residuos de aminoácidos, representa una herramienta más para determinar la estructura de algunas proteínas que los métodos actuales (cristalografía de rayos X, NMR entre otros), no han logrado resolver; esta herramienta se fundamenta en el hecho de que las proteínas con secuencias de aminoácidos similares tienden a adoptar una estructura tridimensional similar y por consiguiente una función similar.

Las estructuras cristalográficas recientes de CYPs de mamíferos han demostrado que su estructura total se conserva y se asemeja a los CYPs bacterianos, por lo cual la estructura P450*cam* de *Pseudomonas putida*, se ha utilizado como modelo para comprender la relación estructura-función de los CYPs¹¹. De hecho, de 1994 a 2004 se han modelado diferentes estructuras de la familia de CYP, como 1A1, 1A2, 2A1, 2A4, 2A5, 2A6, 2A13, 2B1, 2B4, 2B6, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 Y 4A11, estos modelos se han desarrollado por homología a partir del plegamiento tridimensional de 5 estructuras básicas (BM3, *cam*, *terp*, *eryF* y 2C5) utilizando una a la vez o varias en conjunto¹².

1.2.1 Estructura tipo: P450*cam* de *Pseudomonas putida*

La enzima P450**cam** se encarga de metabolizar al alcanfor (**camphor**), su estructura esta formada por un plegamiento de 12 α -hélices y 5 hojas- β antiparalelas (figura 3), que semeja a un prisma triangular con el extremo amino-terminal sobre el lado superior derecho y el extremo carboxilo-terminal al fondo como se puede observar en la figura 4, del lado superior izquierdo se observa un dominio rico en α -hélices mientras que del lado inferior derecho son hojas β , que encierran al grupo hemo coordinado por un enlace tiol en el núcleo hidrofóbico de la proteína¹¹.

El sitio de unión al sustrato esta encerrado dentro del núcleo de la proteína sobre el lado distal del grupo hemo, siendo el grupo hidroxilo de la Tyr96 que se une por un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del alcanfor y a lo largo interacciona hidrofóbica y estéricamente con las cadenas laterales en el sitio de unión, lo que permite una reorganización estructural de la enzima¹¹.

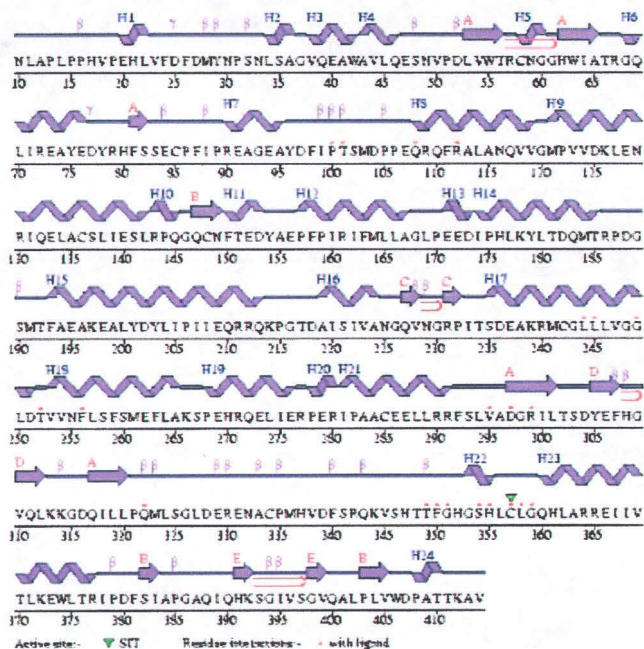


Figura 3. Estructura primaria y secundaria de P450cam de *Pseudomonas putida*, imagen obtenida de PDBsum¹³.

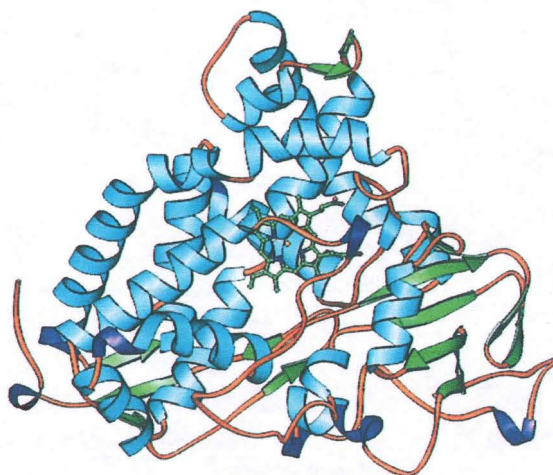


Figura 4. Estructura tridimensional de P450cam de *Pseudomonas putida* (PDB: 1PHC), imagen obtenida con Ribbons 3.0¹⁰.

Análisis experimentales y de cómputo sugieren que la enzima P450cam controla la entrada del sustrato y la salida de los productos por cambios estructurales y asociaciones sustrato dependientes, estos cambios pueden implicar el movimiento de las regiones que reconocen al sustrato para que este se pueda unir y ajustar alrededor de la forma y así acomodar al sustrato, lo que algunos autores consideran como plasticidad estructural¹¹.

Lüdemann en 2000 propone que las cadenas laterales de Tyr29, Phe87, Tyr96, Phe98, Phe193 o Tyr201, pueden rotar actuando como puertas o palancas que empujan a los sustratos y ajustan la estructura como en el caso de Tyr201 que afecta a Lys197, que forma un puente salino con Asp97 permitiendo que el alcanfor sea expulsado. Se han determinado otros puentes como el formado entre Lys178-Asp251 y Arg186-Asp251 que auxilian en el cierre del canal que da acceso al sustrato; los residuos Tyr29, Ala194, Phe87 y Phe193 intervienen en este proceso a través de diferentes rutas propuestas para la expulsión de los sustratos¹⁴, estas rutas y los residuos de aminoácidos implicados en ellas se pueden observar en el cuadro 2.

Ruta	Residuos de aminoácidos
1	L244, Y96, G248, F98, V247, M184, G243, L127, V118
2 ^a	D297, V396, I395, Y96, G248, L244, A296, G298, F87, I88, A92
2 ^b	P86, I88, G298, Q317, I318, R299, H62, L319, C85, R90, E94
2 ^c	V396, G248, F98, M184, V247, K197, L200, Y201, K239, G198
3	V247, M184, G243, L200, L246, L177, Y203, D173, P170, G172

Cuadro 2. Residuos de aminoácidos implicados en las rutas de expulsión de los sustratos¹⁴.

Estudios de interacción proteína-sustrato han demostrado que se requieren tres moléculas de solvente para formar un canal que conecta a la Thr252 con el Glu366, el cual se localiza al lado contrario de los propionatos del grupo hemo, pero cuando la enzima carece de sustrato, solo queda una o dos moléculas del solvente cercanos a la cadena lateral del glutamato, el cual se considera que puede ser una fuente de protones requeridos en el enlace O-O durante el ciclo catalítico de P450.^{12,15}

En 1997, Oprea y colaboradores postularon la formación de un acueducto desde el sitio activo a un grupo de agua localizado sobre el lado tiol del grupo hemo, cercano a la superficie de la proteína, este grupo de agua es parcialmente remplazado por la cadena lateral de Arg299 la cual permite la salida de las moléculas de agua a la superficie o su regreso al sitio activo, este movimiento se favorece por un ambiente altamente polar generado por la carga positiva de la His355, permitiendo alternar entre los diferentes estados. Esta arginina se conserva en todas las estructuras conocidas de CYPs y al formar un puente salino con uno de los propionatos del grupo hemo, le confiere una mayor estabilidad.⁹

1.3 Sustrato

Se ha documentado que los CYPs catalizan cerca de 1000 sustratos con una amplia variedad de estructuras, por lo cual, sus reacciones son selectivas y en ocasiones altamente específicas, interviniendo cerca de 40 tipos de reacciones, tales como la oxidación, la hidroxilación, la epoxidación, la desalquilación, la reducción y la deshidrogenación, entre otras más³.

En el 2002, Groot y Ekins, realizaron una revisión de los mapas tridimensionales de todas las conformaciones de un conjunto de ligandos en los CYPs y usando la información sobre el sitio activo, tales como la forma, las propiedades electrónicas y la conformación del sustrato, inhibidor o productos metabólicos, encontraron muchas características comunes entre los CYP's, sin embargo, al comparar las contribuciones electrostáticas contra las interacciones hidrofóbicas y la flexibilidad del sitio activo, estas varían dramáticamente¹⁶.

Lewis en 2003, a través de modelos moleculares y estudios cuantitativos de factores estructurales y de afinidad de sustrato, formuló criterios generales que gobiernan la afinidad de la unión y la selectividad del sustrato¹⁷, los cuales mencionamos a continuación:

- 1) El número y disposición de puentes de hidrógeno con donadores y aceptores en la molécula.
- 2) El número y disposición de anillos aromáticos en la molécula del sustrato.
- 3) El número de enlaces rotables formados al unirse a la enzima.
- 4) El tamaño y la forma del sustrato, incluyendo planaridad (área/profundidad²) y rectangularidad (proporción largo / ancho).
- 5) La hidrofobicidad/lipofilidad del sustrato, incluyendo su característica ácido/base.

2. Filogenia de CYP450.

2.1 Familia CYP2

La familia CYP2 se distribuye ampliamente en mamíferos y se considera que inicialmente tuvo funciones vitales que han evolucionado para intervenir en la degradación de compuestos producidos por las plantas o metabolizar los fármacos prescritos en la actualidad, algunos de los cuales son sintetizados a partir de metabolitos de plantas⁴.

La familia CYP2 metaboliza el 54% de los fármacos por reacciones de oxidación de fase I, en esta fase las enzimas que intervienen causan un cambio en la molécula del fármaco a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, mientras que en la fase II se transfieren grupos funcionales como sulfatos, metilos, glutatión entre otros a los productos de la fase I para formar conjugados².

Enzimas como CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 Y CYP2C19 metabolizan la mitad de todos los medicamentos prescritos, el ácido araquidónico y algunos esteroides. Estudios realizados *in vitro* demostraron que el CYP2D6 metaboliza más de 75 fármacos utilizados en la actualidad. Otras enzimas como CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1 y CYP2J2 también metabolizan otros fármacos, mientras que para CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1 y CYP2W1 no se ha identificado su función⁴.

- 1) El número y disposición de puentes de hidrógeno con donadores y aceptores en la molécula.
- 2) El número y disposición de anillos aromáticos en la molécula del sustrato.
- 3) El número de enlaces rotables formados al unirse a la enzima.
- 4) El tamaño y la forma del sustrato, incluyendo planaridad (área/profundidad²) y rectangularidad (proporción largo / ancho).
- 5) La hidrofobicidad/lipofilidad del sustrato, incluyendo su característica ácido/base.

2. Filogenia de CYP450.

2.1 Familia CYP2

La familia CYP2 se distribuye ampliamente en mamíferos y se considera que inicialmente tuvo funciones vitales que han evolucionado para intervenir en la degradación de compuestos producidos por las plantas o metabolizar los fármacos prescritos en la actualidad, algunos de los cuales son sintetizados a partir de metabolitos de plantas⁴.

La familia CYP2 metaboliza el 54% de los fármacos por reacciones de oxidación de fase I, en esta fase las enzimas que intervienen causan un cambio en la molécula del fármaco a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, mientras que en la fase II se transfieren grupos funcionales como sulfatos, metilos, glutatión entre otros a los productos de la fase I para formar conjugados².

Enzimas como CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 Y CYP2C19 metabolizan la mitad de todos los medicamentos prescritos, el ácido araquidónico y algunos esteroides. Estudios realizados *in vitro* demostraron que el CYP2D6 metaboliza más de 75 fármacos utilizados en la actualidad. Otras enzimas como CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1 y CYP2J2 también metabolizan otros fármacos, mientras que para CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1 y CYP2W1 no se ha identificado su función⁴.

2.2 CYP2D6

La enzima CYP2D6 tiene una gran importancia en el metabolismo de 25% de los fármacos prescritos en la actualidad incluyendo antiarrítmicos, antidepresivos, analgésicos, antipsicóticos, anticonvulsivos, antihistamínicos, antihipertensivos, estimulantes, entre otros, además de estar involucrado en el metabolismo de ciertos contaminantes ambientales o ingeridos en la dieta. Se ha reportado una gran cantidad de polimorfismos que pueden acelerar o reducir su función enzimática.

La enzima CYP2D6 se expresa en varios tejidos como el hígado, riñón, cerebro, placenta, mama y pulmón; el gene que regula su expresión esta formado por 9 exones y 8 intrones, se encuentra en el locus CYP2D ubicado en el brazo largo del cromosoma 22, en la posición 22q13.1; CYP2D6 esta acompañado por dos pseudogenes: CYP2D8 y CYP2D7, ubicados en regiones continuas cercanas a los 45 KB (Figura 5). Se ha calculado el tiempo de divergencia entre CYP2D6 y CYP2D8 en 18 millones de años, mientras que para CYP2D6 y CYP2D7 son 9 millones de años¹⁸.

CYP2D8 presenta diversas deleciones e inserciones que no abren el marco de lectura, indicando un largo tiempo de inactividad en humanos; mientras que CYP2D7 solo tiene una sola inserción (T138) en el primer exón causando un corrimiento en el marco de lectura, sin embargo, Pai y colaboradores reportaron que la mutación 138delT, modifica al codón de paro TGA por GAG, permitiendo la completa traducción del gen CYP2D7, expresándose solo en cerebro¹⁹.

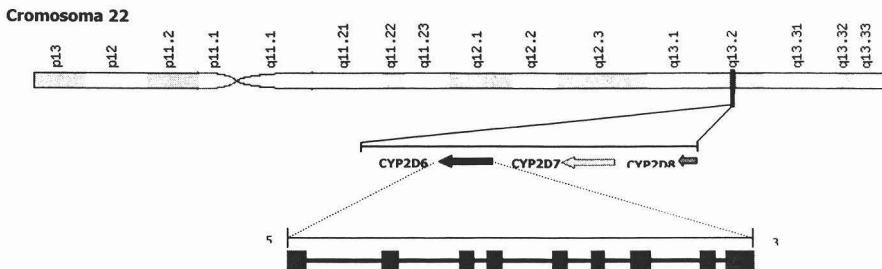


Figura 5. Ubicación del loci CYP2D y la composición del gen CYP2D6, con base en NCBI²⁰.

2.2.1 Estructura de CYP2D6

La proteína de CYP2D6 es una cadena polipeptídica de 496 residuos de aminoácidos. Existen diferentes modelos creados por homología con respecto al p450 B-3 o CYP2C5 sin embargo al tratar de estudiar estos modelos difieren uno de otro en los sitios activos y los cristales obtenidos no son de buena calidad, por lo cual los estudios se han basado en modelos por homología, los cuales han permitido conocer los aminoácidos esenciales y algunas regiones importantes.

Gotoh en 1992 alineó las secuencias de varios miembros de la subfamilia CYP2 pertenecientes a bacteria, ratón, rata, conejo, perro y humano; encontrando seis sitios de reconocimiento del sustrato (SRS), ubicando al SRS1 entre la hélice B' y sus regiones cercanas; el SRS2 en el carboxilo terminal de la hélice F; el SRS3 el amino terminal de la hélice G; el SRS4 el amino terminal en la parte central de la hélice I; el SRS5 el área del hoja β 3 y finalmente el SRS6 en el área central de la hoja β 5²¹; mientras que Lewis (2001) ubicó estas mismas regiones en secuencias de CYPs incluyendo a CYP2D6³, la ubicación de estas regiones y los aminoácidos en la secuencia de CYP2D6 se puede observar en la figura 6.

	10	20	30	40	50	60
	MGLEALVPLA	VIVAI FLLLV	DLMHRC	RWA	ARYPPGPLPL	PGLGNLLHVD FONTPYCFDQ
	70	80	90	100	110	120
	LRRRFGDVFS	LQLAWTPVVV	LNGLAAVREA	LVTHGEDTAD	RPPVPITQIL	GFGPRSQGVE
1	130	140	150	160	170	180
	LARYGPAWRE	QRRFSVSTLR	NLGLGKKSLE	QWVTEEAACL	CAAFANHSGR	PFRPNGLLDK
	190	200	210	220	230	240
	AVSNVIASLT	CGRRFEYDDP	RFLR	LLDLAQ	EGLKEES	3FL
	250	260	270	280	290	300
3	LRPQKA	FLTQ	LDELLTEHRM	TWDPAQPPRD	LTEAFLAEME	KAKGNPESSF
	310	320	330	340	350	360
	DLFSAGMVT	STTLAWGLLL	MILHPDVQRR	VQQEIDDVIG	QVRRPEMGDQ	AHMPYTTAVI
	370	380	390	400	410	420
	HEVORF	GDIV	PLGMR	MTSR	DIEVQGFRI	PGTTLITNLS
	430	440	450	460	470	480
	LDAQHFVKP	EAFLE	FSAGR	RACL	SEPLAR	MELFLFPTSL
	490					
6	EAFIV	SPSPY	ELCAVPR			

Figura 6. Regiones funcionales de CYP2D6: amarillo anclaje a la membrana, verde regiones de reconocimiento del sustrato (SRS) y azul unión al grupo hemo. (Basado en Lewis, D. 2001³).

A partir de diversos estudios de mutagénesis y métodos computacionales como la homología y el docking molecular, se ha logrado identificar a los aminoácidos esenciales en el metabolismo de los diferentes sustratos para CYP2D6, tales como Thr107, Val119, Glu216, Asp301, Ser304, Val374 y Phe481, los cuales pueden interaccionan con ciertas regiones de los sustratos, solos o en conjunto dependiendo del tamaño y la forma del sustrato, orientándolo y estabilizándolo dentro del sitio activo.

Paine y colaboradores (2004) han demostrado la importancia de los aminoácidos Glu216 y Asp301 en la especificidad del sustrato al metabolizar compuestos nitrogenados; otros estudios sugieren que el Glu216 es determinante en la unión de sustratos nitrogenados grandes junto con el carboxilo del Asp310. Cuando es mutado el Asp301 se reduce la actividad catalítica de CYP2D6 recombinante en levaduras; sugiriendo que la acidez de este aminoácido permite formar un enlace iónico entre la amina protonada del sustrato con el anión carboxilo del Asp301 a pH fisiológico²²; sin embargo es necesario que la Ser304 se encuentre junto al Asp301 para crear un ambiente favorable en el sitio activo para el plegamiento de proteína, la incorporación del grupo y/o el estado del hierro²³.

Además, se considera que el Asp301 tiene un papel estructural adicional ya que forma un puente de hidrógeno con los residuos Val119 y Phe120 en el asa B'-C;²² la cadena lateral de este último residuo puede influir en la unión del sustrato; de tal forma que al utilizar el mutante F120A, no se reduce la afinidad del dextrometofano, pero al analizar sus metabolitos por HPLC se descubrió un nuevo producto el 7-hydroxi-dextrometofano, sugiriendo que la cadena lateral de Phe120 puede influir en la regio-especificidad de la oxidación del sustrato²⁴.

La Phe120 es auxiliada por los residuos Phe481 y Phe483 localizados en el asa de la hoja β 1-4, para orientar al ligando de acuerdo a la carga del sustrato²⁴; sin embargo, Hayhurst y colaboradores consideran la faltan de estudios que corroboren la función del Phe483 mientras que para la Phe481 postula que su

función es de estabilidad a través de la formación de interacciones hidrofóbicas²⁵ vía π - π entre su anillo fenol y el anillo aromático del ligando²⁶.

Algunos polimorfismos que colindan con los aminoácidos indispensables para la interacción con el sustrato pueden influir en el ambiente del sitio activo de la enzima, reduciendo de esta forma la interacción con el sustrato, como es el caso del alelo *17²⁸; otros alelos afectan el plegamiento de la proteína modificando la especificidad del sustrato como sucede con el alelo *10; otros más, actúan a nivel de membrana como el alelo *12, el cual altera a la Gly42 que le confiere cierta estabilidad a la proteína, ya que estudios con doble mutantes 34/42 reducen la funcionalidad de la enzima²⁹. Finalmente, otros polimorfismos pueden inhibir la expresión de la enzima al producir cambios en el marco de lectura como en el alelo *4.

Sin embargo, aún faltan estudios que permitan conocer la estructura de la enzima y con esto comprender ¿cómo se altera su función con los demás polimorfismos?, por lo cual, es necesario conocer como muta la secuencia de ADN para cambiar los aminoácidos que componen a los diferentes alelos reportados, y explicar con esto las diferencias fenotípicas de los individuos, algunos alelos que producen enzima los podemos observar en el cuadro 3.

2.2.2 Sustrato

Los sustratos metabolizados por CYP2D6 contienen nitrógeno, el cual es protonado a pH fisiológico, una recopilación de los diferentes sustratos, inhibidores y sus interacciones farmacológicas que han sido reportados en la literatura, se han publicado con fines educativos e informativos en la pagina: <http://medicine.iupui.edu/flockhart/spanish.htm>⁵³, algunos sustratos e inhibidores de esta pagina se pueden observar en el cuadro 4 como la debrisoquina, propranolol, codeína, metoprolol entre otros fármacos usados clínicamente en la actualidad.

SUSTRATO	INHIBIDORES
Beta-Bloqueadores: S-metoprolol propafenona timolol	Clorfeniramina clomipramina haloperidol metadona mibefradil ranitidina
Antidepresivos: amitriptilina clomipramina desipramina imipramina paroxetina	
Antipsicóticos: haloperidol risperidona tionidazina codeína dextrometorfan flecainida mexiletina ondansetron tamoxifen tramadol Venlafaxina	

Cuadro 4. Diferentes compuestos químicos que funcionan como sustrato o inhibidores de CYP2D6⁵³

2.2.3 Polimorfismos de CYP2D6

Un polimorfismo es una variedad genética que puede aparecer en al menos el 1% de la población y el descubrimiento de polimorfismos para CYP2D6 fue un caso de serendipia cuando se usaron dos fármacos para el corazón, uno en desarrollo como antiarrítmico (esparteina) y el otro con licencia para ser usado en Europa para la hipertensión (debrisoquina), sin embargo, se manifestaron una serie de efectos colaterales en un cierto número de pacientes a los cuales se les administró la dosis recomendada²⁷.

A uno de estos individuos se le administró una dosis de debrisoquina produciéndole un colapso con hipotensión vascular, demostrando que era un metabolizador deficiente por tener un polimorfismo en el gen CYP2D6 que produce una enzima defectuosa para la hidroxilación de la debrisoquina²⁷; otros individuos excretaban tanto a la esparteina y a la debrisoquina sin cambios en la orina, mientras que la mayoría de los sujetos excretaban sus derivados metabólicos¹⁸; también se encontraron individuos que metabolizan a la debrisoquina muy rápidamente, resultando en concentraciones plasmáticas por debajo del rango terapéutico, este metabolismo se denominó ultrarrápido y es originado porque el gen de CYP2D6 se había duplicado y en ocasiones se ha encontrado hasta 12 copias en un individuo²⁷.

Con el tiempo se han encontrado más de 52 variedades alelicas para CYP2D6 las cuales dependiendo del polimorfismo puede producir o no una enzima completa o parcialmente funcional, lo que altera el fenotipo de los individuos y con esto el de las poblaciones, por lo cual diversos laboratorios se han dado a la tarea de describir los polimorfismos más frecuentes en diferentes poblaciones alrededor del mundo (cuadro 5). Una lista completa y actualizada de los polimorfismos encontrados y sus efectos se encuentran en la siguiente página:

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm>⁶

Americanos						
Alelo	Canadá Inuit	USA Mex-Ame	Panamá Ngawbe	Colombia Embera	Colombia Mestizos	Chile Mapuche
N	152	349	344	153	121	84
1	ND	ND	ND	ND	0.388	~
2	ND	0.228	ND	ND	0.37	~
3	0	0.003	0	0	0.012	0
4	0.067-0.083	0.103	0.171	0.14	0.194	0.036
5	ND	0.023	0	0	0.008	~
6	0	ND	0.005	0.011	0	ND
7	ND	ND	ND	ND	0	ND
8	ND	ND	ND	ND	0	ND
9	ND	ND	0	0	ND	ND
10	0.022	0.074	0.175	0.069	ND	0.018
16	ND	ND	0	0	ND	ND
17	ND	0.007	ND	ND	0.016	ND
Referencia	Jurima-Romet M 1997	Mendoza 2001	Jorge LF 1999	Jorge LF 1999	Isaza CA 2000	Muñoz S 1998
Afroamericanos de USA y Africanos						
Alelo	USA Atlanta	USA S. California	USA Los Angeles	Tanzania	Ghanaian	
N	502	308	246	212	386	
1	0.297	0.345	0.83	0.278	0.437	
2	0.191	0.269	ND	0.203	0.109	
3	0.002	0.003	0.006	0	0	
4	0.054	0.078	0.073	0.009	0.07	
5	0.066	0.062	0.069	0.061	0.006	
6	0.004	ND	ND	0	0	
7	0	ND	ND	ND	0	
8	0	ND	ND	ND	0	
9	0.002	ND	ND	ND	0	
10	0.036	0.075	ND	0.038	0.031	
11	0	ND	ND	ND	ND	
12	0.002	ND	ND	ND	ND	
14	0	ND	ND	ND	ND	
15	0	ND	ND	ND	ND	
17	0.213	0.146	0.26	0.17	0.277	
18	0	ND	ND	ND	ND	
29	0.072	ND	ND	0.198	ND	
40	0.006	ND	ND	ND	ND	
Referencia	Gaedigk A 2002	Wan YJ 2001	Leathart JB 1998	Wennerholm A 2001	Griese UE 1999	

Cuadro 5. Frecuencias Alélicas de CYP2D6 en poblaciones mundiales. **ND**= No identificado.
~ Valores similares a las poblaciones reportadas.

Asiáticos y Australianos							
Alelo	Arabia Saudita	Japoneses	Tamilian	Malasia Chinos	Malasia Malasios	Siberia Nentsi	Australia Aborigen WE
N	101	162	106	223	107	96	250
1	ND	0.552	0.722	ND	0.36	ND	0.851
2	ND	ND	ND	?	ND	ND	ND
3	ND	0.0	0.0	0.0	ND	ND	ND
4	0.035	0.0	0.066	?	0.028	0.07	-0.1
5	ND	0.062	0.009	0.072	0.051	ND	-0.1
6	ND	ND	ND	0.0	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	0.0	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	0.033	ND	ND
10	0.03	0.386	0.203	0.516	0.495	ND	ND
14	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-0.1
17	0.03	ND	ND	ND	0.005	ND	ND
Referencia	Mc Lellan 1997	Kubota T. 2000	C. Adithan 2003	Ji L. 2002	The LK 2001	Duzhak T 2000	Griese EU 2001
Europeos							
Alelo	Turquia Turcos	Croacia Croatas	Polonia Polacos	Rusia Voronezh	Alemania Alemanes	Italia Messina	
N	404	200	300	290	589	360	
1	0.37	0.765	0.757	0.708	0.364	0.750	
2	0.35	0.04	ND	ND	0.324	0.042	
3	ND	0.0275	0.013	0.01	0.020	0.007	
4	0.11	0.14	0.23	0.182	0.207	0.153	
5	0.01	0.01	ND	0.024	0.020	0.034	
6	ND	0.015	ND	0.012	0.009	0.014	
7	ND	.ND	ND	ND	0.001	ND	
8	ND	ND	ND	ND	0	ND	
9	ND	ND	ND	ND	0.018	ND	
10	0.06	ND	ND	0.042	0.015	ND	
11	ND	ND	ND	ND	0	ND	
12	ND	ND	ND	ND	0	ND	
13	ND	ND	ND	ND	0	ND	
14	ND	ND	ND	ND	0	ND	
15	ND	ND	ND	ND	0.001	ND	
Referencia	Aynacioglu AS 1999	Bozina N 2003	Niewinski P 2002	Galkovitch EA 2003	Sachse C 1997	Scordo MG 2004	

Cuadro 5. Frecuencias Alélicas de CYP2D6 en poblaciones mundiales (Continuación).

3. Estructura de la Población Mexicana

Diferentes teorías tratan de explicar el origen del hombre americano, a través de estudios paleo-anropológicos, genéticos, antropomórficos y lingüísticos, no obstante, no todas las pruebas han sido completamente aceptadas, por lo cual su origen aún sigue en controversia; algunos autores consideran que los primeros pobladores llegaron en una compleja serie de migraciones ocurridas a lo largo del tiempo a partir de diferentes rutas terrestres y marinas desde Asia, Europa y Australia (Figura 7).

La teoría más aceptada es la terrestre postulando que el ancestro del hombre americano cruza a pie a través de Beringia, un puente de tierra formado entre Siberia y Alaska cuando bajó el nivel del mar debido a la última glaciación "Wisconsin". Otras teorías consideran el uso de embarcaciones que siguieron las orillas de las costas o de los hielos, mientras que otros se aventuraron a mar abierto siguiendo corrientes marinas, complementadas por el viento, aunque solo se ha demostrado que es posible hacer esos viajes a través de embarcaciones sencillas de vela. Aún faltan muchos estudios que permitan correlacionar quienes fueron los primeros pobladores de América, por lo cual Vance Haynes expone: *"No importa como ocurrió; hay que ver a esa gente como exploradores obsesionados de lo que había atrás de la última colina"*⁵⁴.

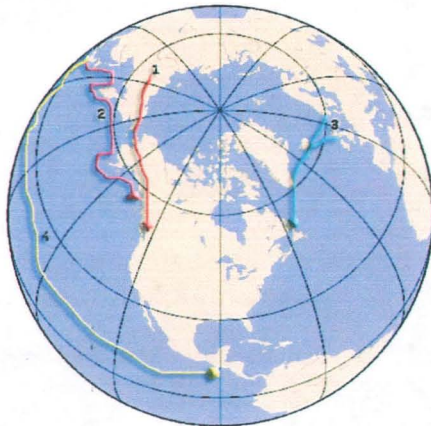


Figura 7. Rutas utilizadas por los antiguos pobladores de América.

- 1.- Estrecho de Bering. Vía terrestre y marítima, usada por mongoloides y asiáticos.
- 2.- Corriente Kuro Shivo. Vía marítima, usada por la cultura Jomón de Japón.
- 3.- Europa Occidental, Vía terrestre y marítima, usada por Solutrenses y Normandos.
- 4.- Pacífico Medio. Vía marítima, usada por Chinos, en latitudes menores usada por Polinesios y Melanesios; cerca de la Antártica usada por los australianos.

De las culturas asentadas en el valle de México se conocen muy bien sus costumbres y el periodo en el que iniciaron, florecieron y decayeron, pero aún se desconoce su origen exacto y el porque abandonaron sus asentamientos, lo que sí queda claro es que los primeros pobladores se distribuyeron hacia el sur en tribus que crearon alianzas o conflictos con otros grupos, lo que les permitió entrecruzarse y compartir ciertos elementos culturales, adecuándose a las condiciones ecológicas de la época, de tal forma que se diferenciaron sus culturas y pasaron de familias rudimentarias y nómadas a estados imperiales con grandes culturas como la Olmeca, Tolteca, Teotihuacana, Zapoteca, Mixteca, Azteca y Maya⁵⁵.

Con la llegada de los españoles y la subsiguiente época colonial en el siglo XVI, la sociedad de la Nueva España, estaba integrada por tres razas: la indígena, la española y la negra. La raza negra que provenía de África era forzada a trabajar como esclavos en la explotación de minas u otros trabajos pesados en América, por lo cual, su proporción fue reducida y asociada a las costas tanto occidental como oriental en las cuales desembarcaron. Al mezclarse estas razas dieron origen a grupos secundarios denominados castas y estas mismas se continuaron entrecruzando formando una complicada estructura social⁵⁶ como se puede observar en el cuadro 6.

Casta	Ascendencia
Mestizo	Español con indígena
Zambo	Indígena con negra
Zambo Prieto	Negro con zamba
Mulato	Español con negra
Morisco	Mulata con español
Albino	Español con morisca
Salta atrás	Albino con español
Coyote	Indígena con mestizo
Harnizo	Español con coyote
Chamizo	Coyote con indígena
Cambujo	Chino con indígena
Tente en el aire	Cambujo con indígena
No te entiendo	Tente en el aire con china
Albarazado	Mulato con tente en el aire

Cuadro 6. Sistema de clasificación de algunas castas en la Nueva España en el siglo XVIII⁶².

Para conocer la influencia que tuvieron los españoles, los indígenas y los negros en la composición genética de las poblaciones mexicanas actuales, Lisker y colaboradores han realizado estudios con marcadores genéticos sanguíneos, encontrando que: 1) Existen variaciones muy acentuadas, lo que sugiere una composición genética heterogénea. 2) No existen grupos indígenas puros, pero en aquellos grupos con un mayor aislamiento como los Huicholes, sus genes son predominantes con respecto a los españoles. 3) Los genes africanos se encontraron en una gran proporción en la Costa Este y en una menor proporción en los mestizos de 6 ciudades estudiadas⁵⁷, como podemos observar en el cuadro 7.

Población	Genes de origen		
	Español	Indígena	Negro
Indígenas			
Cora	0.200	0.792	0.008
Chol	0.222	0.778	--
Chontal	0.167	0.783	0.050
Huasteco	0.373	0.627	--
Huichol	0.088	0.912	--
Mazateco	0.166	0.834	--
Nahua	0.296	0.704	--
Totonaco	0.146	0.854	--
Zapoteco	0.259	0.741	--
Mestizos (Costa Este)			
El Carmen (Camp.)	0.284	0.432	0.284
Paraíso (Tab.)	0.309	0.474	0.217
Saladero (Ver.)	0.312	0.386	0.302
Tamiahua (Ver.)	0.288	0.307	0.405
Veracruz (Ver.)	0.350	0.394	0.256
Mestizos			
Distrito Federal	0.408	0.562	0.030
León (Guan.)	0.403	0.513	0.084
Mérida (Yuc.)	0.429	0.512	0.059
Oaxaca (Oax.)	0.306	0.676	0.018
Puebla (Pue.)	0.330	0.563	0.107
Saltillo Coah.)	0.380	0.547	0.073

Cuadro 7. Proporción de Ancestros Españoles, Indígenas y Negros. Lisker, R, y Armendares S. 2001 ⁵⁷

En otros estudios se sugiere que la proporción de genes caucásicos aumentan conforme mejora la condición socioeconómica del grupo estudiado; un estudio realizado en el Distrito Federal en alumnos de escuelas particulares se apreció que el componente español aumentaba en un 71%⁵⁷.

Finalmente Lisker considera que la población mexicana esta constituida por 3 sectores: 1) grupos indígenas, distribuidos en todo el país; 2) grupos representativos de la costa occidental y oriental y 3) habitantes de las grandes urbes; también señala que no existen razas indígenas puras en el país ya que todas tienen cierta mezcla con otras etnias, fundamentalmente la española o la negra en las costas. En las grandes ciudades hay alrededor del 50% de ancestros indígenas, un 40% de caucásicos y el resto es población negra, por lo cual se considera a la población mexicana como un mosaico etnográfico⁵⁸.

JUSTIFICACIÓN

CYP2D6 metaboliza sustancias endógenas y exógenas que incluyen a contaminantes ambientales y un 25% de los fármacos prescritos en la actualidad, esta enzima se ha asociado con la falta de eficacia en los tratamientos médicos, debido al elevado número de polimorfismos reportados, los cuales pueden inhibir o producir una enzima con una configuración inestable al no anclarse a la membrana o ser ineficiente para reconocer el sustrato o para unirlo al sitio activo generando metabolitos farmacológicamente inactivos. Dado que algunos polimorfismos de CYP2D6 alteran la actividad enzimática se considera que podrían representar un aumento en los factores de riesgo para ciertos tipos de cáncer y producir efectos adversos a los medicamentos.

HIPOTESIS

Debido a la gran dinámica poblacional y al entrecruzamiento entre las diferentes etnias que se ha dado a lo largo del tiempo en la ciudad de México esperamos encontrar similitudes en sus frecuencias alélicas con respecto a las frecuencias reportadas para otras poblaciones del mundo.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la estructura y determinar la frecuencia alélica de las variantes 1, 2, 4 y 10 de CYP2D6 en habitantes de la Ciudad de México y analizar su relación evolutiva con los diferentes grupos étnicos reportados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Conocer la estructura de CYP2D6
- 2.- Analizar la distribución actual de CYP2D6 en una población del Distrito Federal.
- 3.- Determinar la relación evolutiva de los polimorfismos de CYP2D6.

METODO

Para este estudio se utilizaron muestras provenientes de dos hospitales: Hospital General "Dr. Manuel Gea González" SS y del Hospital "20 de noviembre"; de este último se implementó un Banco de ADN en el Instituto de Investigaciones Biomédicas a cargo de la Dra. Julieta Rubio y la Dra. Clementina Castro. Se utilizaron muestras de 138 individuos mexicanos, que radican en la ciudad de México y zona conurbana, el tamaño mínimo de muestra necesario para este estudio se calculó con la siguiente fórmula:

$$No.muestra = \frac{\ln \frac{100}{100 - \text{°Certeza}}}{\ln 1 + \frac{\text{Frecuencia}}{100}}$$

El grado de certeza utilizado fue de 99%, obteniendo como mínimo 90 individuos para el alelo *10 cuya frecuencia de acuerdo a Mendoza es del 7.4%.

Extracción de ADN.

Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante, para la extracción del ADN se utilizó el KIT "Nucleon extraction & purification protocols", cuyo proceso se constituye en 3 etapas, en la primera se realizó una lisis celular, seguida de una desproteización utilizando una solución de perclorato de sodio y finalmente se extrajo el ADN utilizando cloroformo como agente precipitante.

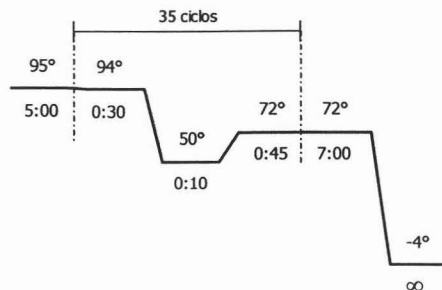
Con el ADN aislado se procedió a identificar las diferentes regiones de ADN reportadas para la expresión de ciertos polimorfismos, estas regiones fueron amplificadas por la técnica de **PCR** (reacción en cadena de la polimerasa), por sus siglas en ingles; en esta técnica cada región específica del ADN a estudiar es limitado por enzimas de restricción, las cuales se unen usando entre 4 y 6

pares de bases, después de desnaturalizar al ADN, separando sus cadenas, se anexan y alinean un par de oligonucleótidos con cada hebra, al unirse una polimerasa termoestable, se sintetiza un nuevo fragmento de ADN entre los dos oligonucleótidos; al terminar reinicia el proceso durante unos 30 o 40 ciclos, obteniendo una mayor cantidad de ADN amplificado.

De las regiones amplificadas por PCR se identifico su genotipo usando la técnica de **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms), esta técnica muestra un patrón de bandas en los geles de agarosa, las bandas se forman debido al flujo de la corriente eléctrica que pasa por estos geles, forzando la migración de los diferentes fragmentos de ADN obtenidos por las enzimas de restricción, esta migración depende del tamaño de los fragmentos de tal forma que a mayor tamaño recorrerá una distancia menor y a menor tamaño su distancia será mayor.

Los diferentes oligos, enzimas de restricción y parámetros del termociclador Perkim Elmer GeneAmp PCR system 9700 empleados para amplificar las diferentes regiones a estudiar las mencionamos a continuación:

Parámetros del termociclador:



Región 433

Exón afectado:
Oligonucleótido:

1
PM11 (TCA ACA CAG CAG CAG GTT CA)
PM12 (CTG TGG TTT CAC CCA CC)

Enzimas de Digestión:
Genotipo Esperado en RFLP:
Patrón de bandas:

Hph I
Alelo *4 y *10

W/W	362, 71
W/M	362, 262, 100, 71
M/M	262, 100, 71

Región 353

Exón afectado: 3 y 4
 Oligonucleótido: P3 (CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA CCA G)
 P2M (GAG ACT CCT CGG TCT CTC G)
 Enzimas de Digestión: BstNI
 Genotipo Esperado en RFLP: Alelo *4 y *6
 Patrón de bandas:

* 4		*6	
W/W	190, 163	W/W	190, 163
W/M	353, 190, 163	W/M	190, 163, 19, 23
M/M	353	M/M	190, 13, 23

Región 201

Exón afectado: 5
 Oligonucleótido: P51 (GCT GGG GCC TGA GAC TT)
 P52 (GGC TGG GTC CCA GGT CAT CC)
 Enzimas de Digestión: BsaAI
 Genotipo Esperado en RFLP: Alelo *3
 Patrón de bandas:

W/W	201
W/M	201, 180, 20
M/M	180, 20

Región 881

Exón afectado: 9
 Oligonucleótido: PM9 (CGT CTA GTG GGG GA CAA AC)
 PM10 (CTC AGC CTC AAC GTA CCC CT)
 Enzimas de Digestión: BanII
 Genotipo Esperado en RFLP: Alelo *2, *4, *10 y *17
 Patrón de bandas:

W/W	420, 235, 107, 101, 18
W/M	420, 336, 235, 107, 101, 18
M/M	420, 336, 107, 18

Región 386

Exón afectado: 5 y 6
 Oligonucleótido: PM9 (CGT CTA GTG GGG GA CAA AC)
 PM10 (CTC AGC CTC AAC GTA CCC CT)
 Enzimas de Digestión: BspM I + Mbo II
 Genotipo Esperado en RFLP: Alelo *2, *34, *9 y *17

* 2, *17		*9	
W/W	230, 124, 32	W/W	230, 124, 32
W/M	354, 230, 124, 32	W/M	262, 230, 124, 32
M/M	354, 32	M/M	262, 124

Una vez obtenidos los resultados de todos los geles de agarosa al 2% se resolvió el o los polimorfismos de cada individuo, algunos de estos polimorfismos coinciden en algunos aminoácidos, como se puede observar en el cuadro 8.

ALELO	433	PCR-TR	353	353	201	386	386	881	3500
1	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
2	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Mt	Mt	Wt
4	Mt	Wt	Wt	Mt	Wt	Wt	Wt	Mt	Wt
10	Mt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Mt	Wt

Cuadro 8. Clasificación de polimorfismos de acuerdo a la identificación de las regiones amplificadas.

RESULTADOS

Diversos estudios estructurales de la enzima CYP2D6, han permitido identificar, a los aminoácidos importantes para la función o la unión de ciertos sustratos, sin embargo debido a la importancia económica que posee su estructura, por su importancia farmacológica, su estructura no es accesible para todo el público, por lo cual se considero conveniente crear un modelo teórico de CYP2D6, este se obtuvo utilizando su secuencia de aminoácidos (NCBI: M33388), la cual se sustituyo en la estructura de CYP2C8, un citocromo microsomal humano con una similitud mayor al 62%, cuya estructura fue identificada a través del escrutinio de BLAST ⁶⁴.

La estructura de CYP2C8 (PDB: 1PQ2), se obtuvo del sitio: www.rcsb.org/pdb ⁶⁵ al igual que la estructura de P450cam (PDB: 1PHC); ambas estructuras se alinearon utilizando el programa SwissPDB viewer⁶⁶ (figura 8), permitiendo correlacionar aquellos aminoácidos que interactúan en el funcionamiento de P450cam y CYP2C8, para así ubicarlos en CYP2D6 al alinear las secuencias de aminoácidos de CYP2C8 y CYP2D6, los cuales se observan en el cuadro 9.

P450cam	CYP2C8	CYP2D6	Función
Phe29	G40	Y56	Canal de solvente
Arg47	S58	E96	Vía de salida del sustrato
Phe87	Glu93	S148	Canal del solvente
Tyr96	Ile102	A157	Rota su cadena lateral
Asp97	Ile113	A158	Puente salino con Lys197
Phe98	Ser114	C159	Vía de salida del sustrato
L177	Phe201	L248	Vía de salida del sustrato
L178	Asn202	T249	Canal de entrada del sustrato
Asp182	Arg206	E253	Canal de entrada del sustrato
Arg186	Ser210	E257	Canal de entrada del sustrato
Phe193	Asn217	P264	Reacomodo para interactuar con sustrato.
Ala194	Asn218	A265	Modelan el acceso y la salida del sustrato
Lys197	Leu221	P268	Puente salino con Asp97
L200	Asp224	L270	Vía de salida del sustrato
Tyr201	Cys225	T271	Vía de salida del sustrato
Gly242	Val291	G317	Interacción con solvente
Val247	Val297	I322	Interacciones con el solvente.
Asp251	Glu300	D326	Canal de entrada del sustrato
Thr252	Thr301	Val327	Donador de protones.
Arg299	Val366	Met374	Interacción con solvente
His355	Arg433	R441	Provee un ambiente polar
Glu366	Glu444	E452	Interacción con solvente

Cuadro 9. Correspondencia de los aminoácidos entre P450cam y CYP2D6

10	20	30	40	50	60
MGLEALVPLA	VIVAIPLLVLV	DLMHRQRWA	ARYPGPLPL	PGLGNLLHVD	FQNTPYCFDQ
70	80	90	100	110	120
LRRRFGDVFS	LQLAWTPVVV	LNGLAVREA	LVTHGETAD	RPPVPTQIL	GFGPRSQGVF
130	140	150	160	170	180
LARYGPAWRE	QRRFSVSTLR	NLGLGKKSLE	QWVTEEAACL	CAAFANHSER	PFRPNGLLDK
190	200	210	220	230	240
AVSNVIASLT	CGRRFYDDP	RFLRLLDLAQ	EELKESGFL	REVLNAVVPVL	LHIPALRGKV
250	260	270	280	290	300
LRFQKAFLTQ	LDELLTEHRM	TWDPAQPPRD	LTEAFLAEME	RAKGNPESSF	NDENLRVVA
310	320	330	340	350	360
DLFSAGMVT	STTLAWGLLL	MILIPDVQRR	VQQEIDDVIG	QVRRPEMGDQ	AHMPYTTAVI
370	380	390	400	410	420
HEVQRFQDQV	PLGMTHMISR	DIEVQGFRIIP	KGTTLITNLS	SVLKDEAVWQ	KPFRFHPEHF
430	440	450	460	470	480
LDAQGHFVKP	EAFLPFSAGR	RACGLGEPLAR	MELFLFFTSL	LQHFSSVSPT	GQPRPSHHGV
490					
FAQLVSPSPY	ELCAVPR				

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de CYP2D6 mostrando en verde (X) aminoácidos esenciales, en azul (X) aminoácidos con interacciones al sustrato o hidrofílicas y rojo (X) los aminoácidos mutados en los diferentes polimorfismos.

Las interacciones cercanas que modifican los microambientes de la proteína y con esto su actividad, se observan en la figura 6 donde la Gly42 afecta a la Gly 44 el cual ha sido reportado en el alelo *12; mientras que la gly212 no afecta la región de Q210 o K214, sin embargo no se han reportado cambios en su actividad metabólica, igual sucede con la Arg296 y I297; el T309 con S311 y V299 con D301; por lo que son necesarios estudios estructurales que confirmen esto.

Finalmente para evaluar la relación filogenética entre las isoenzimas de CYP2D6, se alinearon sus secuencias de aminoácidos a través del programa PAUPSearch de Wisconsin Package⁷², resultando en un árbol filogenético (figura 10), en el cual se observa un grupo que diverge en dos subgrupos que presentan mutaciones en los aminoácidos 34 y 296 respectivamente, los cuales se conservan en 22 alelos de los 36 evaluados; lo cual sugiere que el alelo *39 (con una sola mutación en el aminoácido 486) pudiera ser el ancestro común para estos subgrupos.

Dos casos especiales son los alelos *34 y el *52, el primero solo tiene la mutación del aminoácido 296, mientras que el segundo alelo presenta la mutación de los aminoácidos 34 y 418, lo que sugiere que estos alelos deben de formar grupos independientes que convergen en la mutación de los aminoácidos 296 y 34 respectivamente, lo cual se confirmaría al encontrar otros alelos con la mutación del aminoácido 296 junto con otros aminoácidos mutados, mientras que para el caso del aminoácido 34 deberá de existir un alelo que tenga solo este aminoácido mutado el cual será origen de este grupo, sin embargo estos casos hipotéticos aun no han sido reportados.

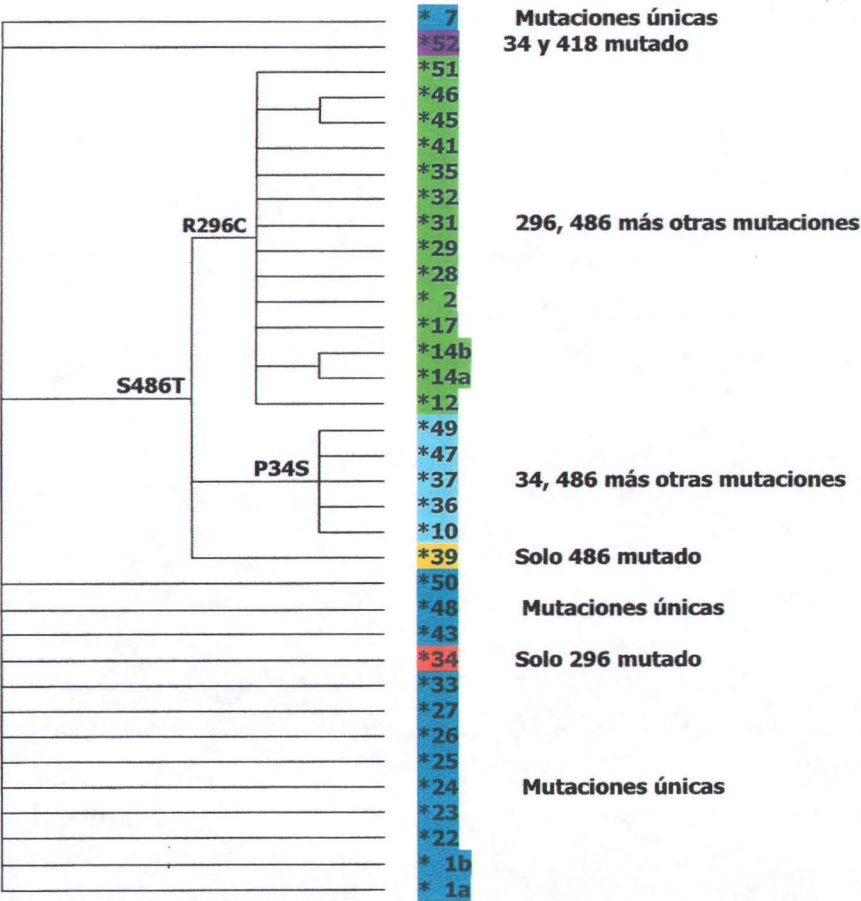
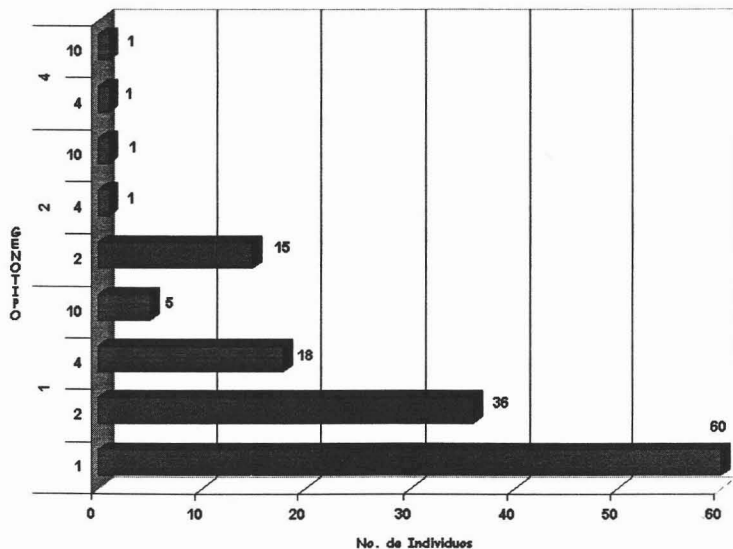


Figura 10. Filogenia de los polimorfismos, que codifican para proteínas, obtenido con GCG-PAUP.

Con lo que respecta a la población en la Ciudad de México, se presentan los diferentes genotipos encontrados y sus combinaciones, siendo 1/1 el más representativo seguido del 2/2, para los homocigos, mientras que para el grupo de heterocigos, fueron 1/2 y 1/4 respectivamente (cuadro 12); la distribución de la población de estudio se puede observar en la gráfica 1 que incluye a todos los individuos y su genotipo.

Alelo 1	Alelo 2	No. Individuos
1	1	60
	2	36
	4	18
	10	5
Subtotal		119
2	2	15
	4	1
	10	1
Subtotal		17
4	4	1
	10	1
Subtotal		2
TOTAL		138

Cuadro 12. Individuos por genotipo de la población en estudio.



Gráfica 1. Distribución de los Individuos por genotipo.

El cálculo de la frecuencia para los alelos *1, *2, *4 y *10, se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$Frecuencia = \frac{(Homocigos \times 2) + Heterocigos}{(N \times 2)}$$

Observando que el alelo *1 es el predominante seguido del *2, *4 y *10 respectivamente, sus frecuencias se compararon con otras poblaciones (cuadro 13), sin embargo, no se obtuvieron datos completos debido a que no se han estudiado todos los polimorfismos, en las diferentes poblaciones.

País	Población	N	*1	*2	*4	*10	Referencia
Canadá	Inuit	152	ND	ND	0.067-0.083	0.022	Jurima-Romet M 1997
USA	Méx-Ame	349	ND	0.228	0.103	0.074	Mendoza 2001
México	D. F.	138	0.65	0.25	0.08	0.02	Obtenidos
México	Durango	110	ND	ND	0.141	0.023	Sosa M. ☼
México	Tepehuanos	88	ND	ND	0.006	0	Sosa M. ☼
Panamá	Ngawbe	344	ND	ND	0.171	0.175	Jorge LF 1999
Colombia	Embera	153	ND	ND	0.14	0.069	Jorge LF 1999
Colombia	Mestizos	121	0.388	0.37	0.194	0.036	Isaza CA 2000
Chile	Mapuche	84	ND	ND	0.036	0.018	Muñoz S 1998

Cuadro 13. Frecuencia alélicas reportadas en diferentes poblaciones de América comparadas con la obtenida durante este estudio. ND= No Determinado. ☼ = Datos por Publicar.

Para conocer si nuestra población se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg, se utilizó la siguiente fórmula modificada para un loci y 4 alelos:

$$HW = p^2 + 2pq + pr + ps + q^2 + 2qr + 2qs + r^2 + 2rs + s^2$$

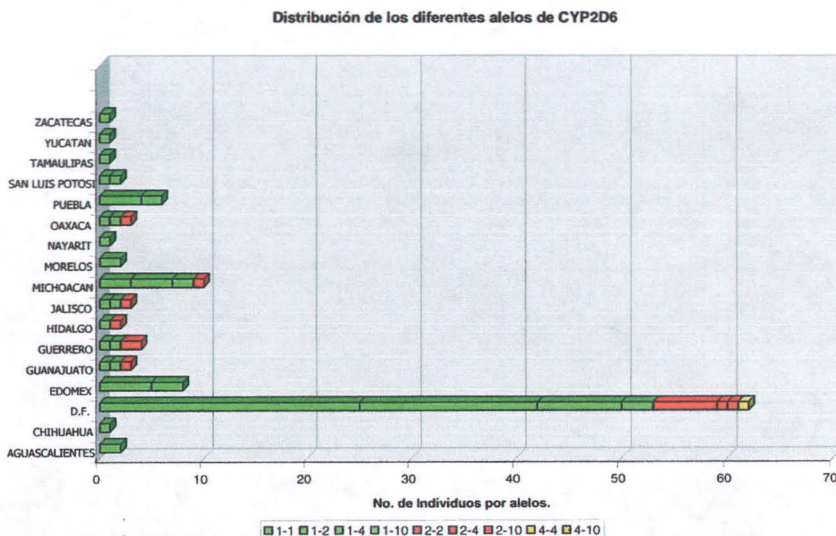
donde p = *1, q = *2, r = *4 y s = *10, aplicando la prueba estadística de χ^2 obteniendo un valor de 4.95 con 9 grados de libertad, dando un valor de P de 1.0, no encontrando diferencias significativas lo que señala que nuestra población se encuentra en equilibrio.

El promedio de la heterocigicidad es una medida que nos permite medir la variación genética, ya que estima la probabilidad de que dos alelos de una población diferente sean utilizados al azar (Cuadro 14), lo que nos muestra una baja heterocigicidad en nuestra población.

Alelo	Heterocigicidad
*1	0.39855072
*2	0.01449275
*4	0.00724638
*10	0
Total	0.4057971
Promedio	0.10507246
Esperada	0.84089477
χ_i^2	0.64387898

Cuadro 14. Heterocigicidad de la Población.

Debido a la dinámica poblacional de la ciudad de México, se realizó la gráfica 2 donde podemos observar el lugar de origen de los individuos en este estudio, siendo el estado de Puebla, Hidalgo y el Estado de México quienes presentan una mayor migración de acuerdo a nuestros datos.



Gráfica 2. Distribución de los alelos por el origen de los individuos, verde corresponde al alelo 1 el color rojo al 2 y amarillo al 3.

Además se agruparon los individuos de acuerdo al origen de sus padres y abuelos, con la finalidad de poder ubicar espacialmente el origen del alelo *4 y *10, encontrando que para el alelo *4 los estados de Hidalgo, Oaxaca y el Estado de México son preponderantes para la distribución de este alelo; mientras que para el alelo *10 son los estados de Puebla y el Estado de México, sin embargo, faltaron datos de algunos individuos para poder ubicarlos y con esto tener una mayor representación estatal (cuadro 15).

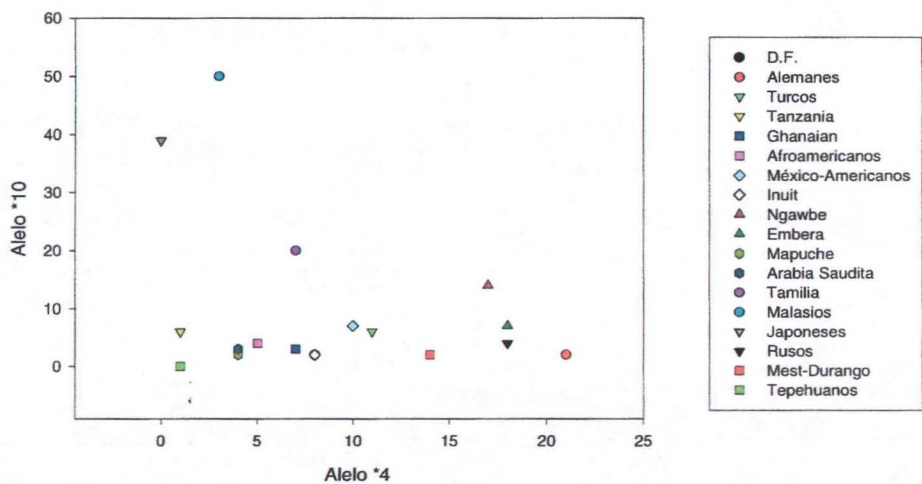
Estado	Individuo	Padres	Abuelos
Alelo *4			
D. F.	50	33.33	37
Edomex	--	16.6	4.2
Hidalgo	5	16.6	16.6
Guanajuato	5	--	4.2
Guerrero	5	--	--
Jalisco	5	--	--
Michoacán	10	8.3	8.3
Oaxaca	5	16.6	8.3
Puebla	--	8.3	8.3
San Luis Potosí	5	8.3	8.3
Veracruz	--	8.3	8.3
Zacatecas	--	--	4.2
ALELO *10			
D. F.	66.66	50	80
Edomex	--	16.6	10
Puebla		33.33	

Cuadro 15. Porcentaje de Individuos por estado de los alelos *4 y *10, el genotipo solamente se dictamino en los individuos, no se incluyeron ni padres ni abuelos.

Finalmente se compararon los datos obtenidos con los reportados en la literatura para diferentes poblaciones en el mundo, a los cuales se aplicó una prueba de χ^2 a través del programa GraphPad v.3 (cuadro 16). En la gráfica 3 se compararon los alelos *4 y *10 para observar una correspondencia espacial.

Población	*1	*2	*4	*10	χ^2	p	Significativo
México - D. F. †	65	25	8	2			
Alemania	36	32	21	2	14.622	0.0022	✓
Rusos	71	ND	18	4	0.2842	0.5939	✗
Turquía	37	35	11	6	11.224	0.0106	✓
Arabia Saudita	ND	ND	4	3	1.036	0.3087	✗
Tanzania	28	20	1	6	10.545	0.0145	✓
Ghanaia	44	11	7	3	2.443	0.4857	✗
Afro-americanos	30	19	5	4	4.204	0.2402	✗
México-Americanos	ND	23	10	7	2.762	0.2513	✗
Mestizos – Colombia	39	37	19	ND	13.261	0.0013	✓
Mestizos – Durango ‡	ND	ND	14	2	0.9147	0.3389	✗
Tepehuanos ‡	ND	ND	1	0	0.3170	0.5734	✗
Inuit	ND	ND	8	2	0	1	✗
Ngawbe	ND	ND	17	14	2.012	0.1561	✗
Embera	ND	ND	18	7	0.2393	0.6247	✗
Mapuche	ND	ND	4	2	0.3556	0.5510	✗
Tamilian	ND	ND	7	20	8.852	0.0029	✓
Malasios	36	ND	3	50	52.880	< 0.0001	✓
Japonés	55	ND	0	39	39.923	< 0.0001	✓

Cuadro 16. Prueba de χ^2 de las frecuencias en porcentaje para las poblaciones reportadas.
 † Frecuencias obtenidas en este experimento, utilizadas para comparar con cada población. ND= No Determinado. ‡ = Datos por Publicar
 Alelo *4 vs *10



Gráfica 3. Comparación de diferentes poblaciones con respecto al alelos *4 vs *10

DISCUSION

En este estudio se encontró que algunas mutaciones de los aminoácidos presentes en los diferentes polimorfismos pueden afectar la estructura y la función de la proteína, como es el caso del alelo *10, que al predecir su estructura secundaria con el residuo P34 ubicado en la región transmembranal, se observa una reducción en la longitud de la α -hélice transmembranal y un aumento en la longitud de la hoja β contigua, reduciendo la función de la enzima como se ha demostrado en estudios con poblaciones orientales²⁹, si bien no se conoce el mecanismo o el impacto de esta hélice sobre la función total de la enzima, se podría sugerir que se trata de una interacción electrostática entre la enzima y la membrana.

Aún cuando no hay estudios de función para otros alelos podemos sugerir que esto mismo ocurrirá en el alelo *14, *36, *37, *49 ya que estos presentan la misma mutación en su secuencia transmembranal. Además un doble mutante es el alelo *47 el cual produce un aumento en la longitud de la α -hélice y de la hoja- β contigua y que junto al alelo *43 también producen cambios estructurales en la región transmembranal; sin embargo es necesario conocer el impacto global de estas mutaciones, lo cual se podrá realizar mediante estudios estructurales, donde se puedan medir las distancias atómicas y las regiones hidrofóbicas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos.

Con lo que respecta a la estructura global, solo logramos reconocer 4 alelos que afectan la función de la proteína por su cercanía con ciertos aminoácidos esenciales o que tienen una interacción hidrofóbica, como sucede con el alelo *49, el cual tiene un doble mutante afectando la región transmembranal en el residuo P34 y un mutante del residuo F120, lo que podría afectar su interacción con el sustrato, modificando al sustrato en una región diferente, sin embargo, no hay estudios que demuestren su función. Mientras que para el alelo *17 el cual se ha encontrado en los africanos, se ha identificado que tiene mutado el

aminoácido T107, el cual interacciona con algunos sustratos y es por esto que se altera su función²⁸.

Será necesario obtener el cristal de CYP2D6 y su estructura tridimensional para poder realizar mejores estudios que permitan conocer con más detalle los mecanismos moleculares, las interacciones electrostáticas entre la misma proteína, proteína-sustrato y proteína-solvente, incluyendo en este último rublo el movimiento de electrones y protones, lo cual en conjunto permitirá explicar las diferencias entre los diferentes polimorfismos y conocer más la estructura de CYP2D6, permitiendo utilizar esta información para predecir el funcionamiento de otros citocromos o permitan valorar el funcionamiento y el impacto de los nuevos fármacos.

Con lo que respecta a la filogenia de los diferentes polimorfismos que producen enzimas, podemos decir que se tratan de mutaciones puntuales que afectan o no la funcionalidad de la enzima, como se mencionó anteriormente el alelo *34 fue el origen del grupo con los aminoácidos mutados 296 y 34 más otros aminoácidos mutados, pero solo el aminoácido 296 no representa una modificación estructural tan severa que afecte la funcionalidad total de la enzima por lo cual se ha logrado preservar en el tiempo, mientras que para el aminoácido 34 como se mencionó anteriormente afecta la función de la enzima al localizarse en la región transmembranal, sin embargo, aún se desconocen las ventajas de estas mutaciones con respecto al alelo *1, e incluso sería interesante comprender la plasticidad estructural que permite adaptar la región del sitio activo con el sustrato y que en conjunto se vería afectado por las diferentes interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de esta región.

Finalmente en este estudio solo se incluyeron 4 alelos de los más importantes, por lo cual para hacer un estudio más completo se deben de incluir los más representativos, en más poblaciones, pero sobre todo se debería de realizar un proyecto a nivel nacional en el que se unifiquen los alelos a estudiar no solo de CYP2D6 sino otros citocromos, ya que esto permitirá crear una red de

información e implementar una farmacogenómica de grupos haciéndola más accesible para todos los individuos y no una farmacogenómica individual que restringiría su acceso por cuestiones económicas, junto con todas las implicaciones que pueda llevar.

Con respecto a la Ciudad de México, los resultados muestran que los alelos *1 y *2 son predominantes en la población de estudio, siendo el alelo *1 el que impera sobre los demás alelos, con una frecuencia del 65%, seguida del alelo *2 con 25%; cabe mencionar que ambos alelos se han asociado con los caucásicos, esto podría estar determinado por el amplio entrecruzamiento de la población mexicana a lo largo de su historia, lo cual es congruente con lo reportado por Lisker y colaboradores (2001), quienes realizaron un estudio con marcadores genéticos sanguíneos, reportando que en una población de la ciudad de México, la carga génica española abarca más del 50%, mientras que los caracteres indígenas corresponden a un 40%, sugiriendo que no existen razas indígenas puras por su entrecruzamiento con otras poblaciones. Por lo cual se explica la amplia distribución del alelo *1 y *2.

Con respecto a los alelos *4 y *10 sus frecuencias se encuentran en menor proporción, 8% y 2% respectivamente; el alelo *4 no se ha asociado a un grupo en particular, sin embargo los grupos con una mayor frecuencia de este alelos son los europeos con valores entre 15% y 23% ⁴⁷⁻⁵², mientras que el alelo *10 se ha asociado a los orientales ya que ellos tienen frecuencias mayores al 40% para el alelo *10 ⁴¹⁻⁴⁴.

Al analizar la distribución del alelo *4 contra el alelo *10 (Gráfica 3), nuestra población se sitúa en una región que compartimos con el grupo indígena Inuit³⁰, Mapuche³⁴, Tepehuanos, México-Americanos³¹, afro-americanos³⁵⁻³⁷ y los grupos africanos³⁸⁻³⁹; en la región superior izquierda encontramos a los orientales que incluyen a los malasio, japoneses y tamilianos⁴¹⁻⁴⁴; mientras que una última región comprende al grupo de los europeos y arriba de ellos a un

grupos de indígenas americanos, esto nos permite sugerir un acercamiento genético entre los grupos que comparten las diferentes regiones encontradas.

Estadísticamente las únicas diferencias significativas se encuentran con los grupos de Alemania, Turquía, Colombia y los orientales; mientras que con otras poblaciones indígenas no hay diferencias significativas, esto se podría explicar si nos remontamos al origen de los pueblos americanos y su relación con los grupos indígenas ancestrales, cuyo aporte génico estaría dado en parte por los pueblos orientales que llegaron en diversas migraciones a lo largo del tiempo⁵⁴. Al comparar estadísticamente las poblaciones de México-Americanos radicados en Estados Unidos, los mestizos y los Tepehuanos en Durango, se encontró que no existe diferencia estadística con nuestra población de estudio, cabe señalar que faltan datos de otras poblaciones indígenas del país que nos permitan correlacionar las tasas de migración que expliquen estas semejanzas en las poblaciones.

Dado que la población de la Ciudad de México es dinámica, ya que constantemente llegan nuevos individuos de otros estados por cuestiones de salud, familiares, turismo o trabajo, encontrando la presencia de 16 estados de la república representados en nuestra población, siendo el Estado de México, Michoacán y Puebla los estados con mayor afluencia; esto permite considerar a la Ciudad de México como un mosaico etnográfico⁵⁸ y que aún cuando nuestra población de estudio se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, se observó que su heterocigocidad tiene valores de un 10%, lo que nos hace plantear que la evolución de los diferentes polimorfismos de CYP2D6 sea por mutaciones puntuales que podrían o no traer ventajas evolutivas a los individuos y que el aumento de ciertos polimorfismos en ciertas poblaciones sea más por efectos fundadores o cuellos de botella, seguidos de la migración de algunos individuos a otras poblaciones lo que debería representar un enriquecimiento génico.

Cabe señalar que es necesario realizar más estudios con un mayor número de alelos, en más poblaciones, incluyendo a la población española, la cual es muy

importante para nosotros y los países de América Latina dada la importancia genética que tuvieron en la época colonial.

Conclusiones

Por todo lo anterior podemos concluir que de los 4 alelos de CYP2D6 estudiados, el alelo *1 es el predominante, por lo cual lo podríamos considerar como un alelo ancestral que nos ha dado ventajas evolutivas a lo largo de la evolución, mientras que para el alelo *2 las mutaciones que presenta en su estructura no afectan la funcionalidad de la enzima, lo cual permite explicar la categoría fenotípica de los metabolizadores normales y que al darse duplicados de estos genes en ciertos individuos se explica porque su fenotipo se denomina ultrarrápido.

El caso contrario sucede para los metabolizadores pobres como el alelo *4 el cual no produce la enzima y cuya funcionalidad metabólica se ve afectada, sin embargo, al presentarse como heterocigoto del alelo 1, su efecto no es tan severo, mientras que con el alelo *10, si se produce una enzima funcional pero con la región transmembranal afectada, implicando una reducción en su funcionalidad.

Finalmente esto nos permite sugerir grupos que incluyan a aquellos polimorfismos que no representen cambios estructurales muy severos que afecten la funcionalidad de la enzima y separar a los polimorfismos que no son funcionales, ya sea porque no producen enzima o porque su enzima no es totalmente funcional como *3, *4, *5, *6, *8, entre otros más; pero hasta que no existan estudios más completos de estructura-función, esta categorización no será posible.

importante para nosotros y los países de América Latina dada la importancia genética que tuvieron en la época colonial.

Conclusiones

Por todo lo anterior podemos concluir que de los 4 alelos de CYP2D6 estudiados, el alelo *1 es el predominante, por lo cual lo podríamos considerar como un alelo ancestral que nos ha dado ventajas evolutivas a lo largo de la evolución, mientras que para el alelo *2 las mutaciones que presenta en su estructura no afectan la funcionalidad de la enzima, lo cual permite explicar la categoría fenotípica de los metabolizadores normales y que al darse duplicados de estos genes en ciertos individuos se explica porque su fenotipo se denomina ultrarrápido.

El caso contrario sucede para los metabolizadores pobres como el alelo *4 el cual no produce la enzima y cuya funcionalidad metabólica se ve afectada, sin embargo, al presentarse como heterocigoto del alelo 1, su efecto no es tan severo, mientras que con el alelo *10, si se produce una enzima funcional pero con la región transmembranal afectada, implicando una reducción en su funcionalidad.

Finalmente esto nos permite sugerir grupos que incluyan a aquellos polimorfismos que no representen cambios estructurales muy severos que afecten la funcionalidad de la enzima y separar a los polimorfismos que no son funcionales, ya sea porque no producen enzima o porque su enzima no es totalmente funcional como *3, *4, *5, *6, *8, entre otros más; pero hasta que no existan estudios más completos de estructura-función, esta categorización no será posible.

Bibliografía.

1. Glenn I, Gandolfi J. (1991) "Biotransformation of toxicants". En Amdur M, Doull J y Klaassen C. Toxicology: The basic science of poisons. 4a. ed. USA: Pergamon, 1033 pp.
2. Lares-Asseff I, Trujillo-Jiménez F. (2001) La farmacogenética y su importancia en la clínica. *Gac Med Mex* 137(3):227-236.
3. Lewis, D. 2001. Guide to cytochromes P450: Structure and function. Inglaterra: Taylor & Francis, 215 pp.
4. Nebert D. 2002, Clinical importance of the cytochromes P450, *The Lancet* 12 Oct 2002, (360):1155-1162.
5. Nelson D. (2005) Cytochrome P450 Homepage. <http://dnelson.utmem.edu/cytochromep450.html> [22/04/2005]
6. Ingelman-Sundberg M, Daly AK. y Nebert DW. (2004) Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee <http://www.imm.ki.se/cypalleles/> [22/04/2005]
7. Ingelman-Sundberg, M. 2002. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 181-182:447-452.
8. Huiying Li, 1997. "Cytochrome P450". En Messerschmidt A. Handbook of metalloproteins. USA: Wiley.
9. Oprea T, Hummer G, García A. 1997. Identification of a functional water channel in cytochrome P450 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2133-2138.
10. Carson M. 1997. Ribbons. *Methods in enzymology* 277:493-502.
11. Hays AM, Dunn A, Chiu R, Gray H, Stout CD, Goodin D. 2004. Conformational states of cytochrome P450cam revealed by trapping of synthetic molecular wires. *J Mol Biol* 344:455-469.
12. Kemp C, Meréchal JD, Sutcliffe M. (2005) Progress in cytochrome P450 active site modeling. *Arch Biochem Biophys* 433:361-368.
13. Laskowski RA, Chistyakov VV, Thornton JM. 2005. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 1(33):266-268.
14. Lüdemann SK, Lounnas V, Wade R. 2000. How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random Expulsion Molecular Dynamics Investigation of Ligand Access Channels and Mechanisms. *J. Mol. Biol.* 303:797-811.
15. Raag R, Poulos T. 1991 Crystal structures of cytochrome P-450_{CAM} complexed with Camphane, Thiocamphor and Adamantane: Factors controlling P-450 substrate hydroxylation. *Biochemistry* 30:2674-2684.
16. Groot M. 2002. Pharmacophore modeling of cytochromes P450. *Adv Drug Deliv Rev* 54:367-383.
17. Lewis D. 2003. Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes. *Arch Biochem Biophys* 409:32-44.

18. Gonzalez F. 1996 "The CYP2D subfamily". En Ioannides C. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological aspects*. USA: CRC Press.
19. Pai H, Kommaddi R, Chinta S, Mori T, Boyd M, Ravindranath V. 2004. A frameshift mutation and alternate splicing in human brain generate a functional form of the pseudogene cytochrome P4502D7 that demethylates codeine to morphine. *J Biol Chem* 279(26):27383-27389.
20. Maglott D, Pruitt K, Tatusova T. 2005. "Entrez Gene: A Directory of Genes". En *The NCBI handbook USA: NCBI* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=handbook.chapter.ch19> [22/04/2005]
21. Gotoh O. 1992. Substrate recognition sites in Cytochrome p450 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267(1):83-90.
22. Paine M, McLaughlin L, Flanagan J, Kemp C, Sutcliffe M, Roberts G, Wolf C. 2003. Residues glutamate 216 and Aspartate 301 are key determinants of substrate specificity and product regioselectivity in cytochrome P450 2D6*. *J Biol Chem* 278(6):4021-4027.
23. Ellis S, Hayhurst G, Lightfoot T, Smith G, Harlow J, Rowland-Yeo K, Larsson C, Mahling J, Lim C, Wolf C, Blackburn M, Lennard M, Tucker G. 2000. Evidence that serine 304 is not a key ligand-binding residue in the active site of cytochrome P450 2D6. *Biochem J* 345:565-571.
24. Flanagan J, Maréchal JD, Ward R, Kemp C, McLaughlin L, Sutcliffe M, Roberts G, Paine M, Wolf C. 2004. Phe¹²⁰ contributes to the regiospecificity of cytochrome P450 2D6: mutation leads to the formation of a novel dextromethorphan metabolite. *Biochem J* 380:353-360.
25. Hayhurst G, Harlow J, Chowdry J, Gross E, Hilton E, Lennard M, Tucker G, Ellis W. 2001. Influence of phenylalanine-481 substitutions on the catalytic activity of cytochrome P450 2D6. *Biochem J* 355: 373-379.
26. Lewis D. 2004. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for substrates of human cytochromes P450 CYP2 family enzymes. *Toxicol In Vitro* 18:89-97.
27. Miranda E, Ostrosky P. 2004. Bases científicas de las respuestas idiosincráticas en la terapéutica I. El papel del gen CYP2D6. *Acta Med Grupo Angeles* 2(1):59-63.
28. Bapiro T, Hasler J, Ridderström M, Masimirembwa C. 2002. The molecular and enzyme kinetics basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant: potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations. *Biochem Pharmacol* 64:1387-1498.
29. Tsuku D, Hichiya H, Okuda Y, Yamamoto S, Tamagake K, Shinoda S, Narimatsu S. 2003. Alteration in catalytic properties of human CYP2D6 caused by substitution of Glycine-42 with Arginine, Lysine and Glutamic Acid. *Drug Metab Pharmacokin* 18(1):79-85.
30. Jurima-Romet M, Foster BC, Casley WL, Rode A, Vloshinsky P, Huang HS, Geertsen S. 1997. CYP2D6-related oxidation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Can J Physiol Pharmacol* 75(3):165-172.
31. Mendoza R, Ivonne Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman M, Lin KM. 2001. CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther* 70(6):552-560.

32. Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. 1999. Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in World populations. *Pharmacogenetics* 9(2):217-228.
33. Isaza CA, Henao J, Lopez AM, Cacaueles R. 2000. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22(9):695-705.
34. Munoz S, Vollrath V, Vallejos MP, Miquel JF, Covarrubias C, Raddatz A, Chianale J. 1998. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics* 8(4):343-351.
35. Gaedigk A., Bradford D., Marcucci K. y Leedor S. 2002. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther* 72(1):76-89.
36. Wan YJ, Poland RE, Han G, Konishi T, Zheng YP, Berman N, Lin KM. 2001. Analysis of the CYP2D6 gene polymorphism and enzyme activity in African-Americans in southern California. *Pharmacogenetics* 11(6):489-499.
37. Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. 1998. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics* 8(6):529-541.
38. Wennerholm A, Johansson I, Hidestrand M, Bertilsson L, Gustafsson LL, Ingelman-Sundberg M. 2001. Characterization of the CYP2D6*29 allele commonly present in a black Tanzanian population causing reduced catalytic activity. *Pharmacogenetics* 11 (5):417-427. Erratum in: *Pharmacogenetics* 2001 11(8):743.
39. Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. 1999. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* 9 (6) :715-723.
40. McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. 1997. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* 7(3): 187-191.
41. Ishiguro A, Kubota T, Sasaki H, Yamada Y, Iga T. 2003. Common mutant alleles of CYP2D6 causing the defect of CYP2D6 enzyme activity in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 55:414-415.
42. Adithan C, Gerard N, Naveen AT, Koumaravelou K, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. 2003. Genotype and allele frequency of CYP2D6 in Tamalian population. *Eur J Clin Pharmacol* 59:517-520.
43. Ji L, Pan S, Wu J, Marti-Jaun J, Hersberger M. 2002. Genetic polymorphisms of CYP2D6 in Chinese mainland. *Chin Med J (Engl)* 115(12):1780-1784.
44. Teh LK, Ismail R, Yusoff R, Hussein A, Isa MN, Rahman AR. 2001. Heterogeneity of the CYP2D6 gene among Malays in Malaysia. *J Clin Pharm Ther* 26(3):205-211.

45. Duzhak T, Mitrofanov D, Ostashevskii V, Gutkina N, Chasovnikova O, Posukh O, Osipova L, Lyakhovich VV. 2000. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1, GSTM1 and p53 genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi. *Pharmacogenetics* 10(6):531-537.
46. Griese EU, Klett KF, Kitteringham NR, Eichelbaum M, Powell H, Spargo RM, LeSouef PN, Musk AW, Minchin RF. 2001. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P4502D6, 2C19 and 2E1 in aborigines from western Australia. *Pharmacogenetics* 11(1):69-76.
47. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmoller J. 1999. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 66(2):185-192.
48. Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramisak I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A. 2003. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J* 44(4):425-428.
49. Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, Forkasiewicz Z. 2002. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol* 58(8):533-535.
50. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. 2003. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 59(4):303-12.
51. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, and Roots I. 1997. Cytochrome P450 *d6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60(2):284-95.
52. Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. 2004. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2c19 and CYP2d6 in an Italian population. *Pharmacol Res* 50(2):195-200.
53. Indiana University Department of Medicine Division of Clinical Pharmacology. 2003. DRUG INTERACTIONS | Cytochrome P450 System. <http://medicine.iupui.edu/flockhart/spanish.htm> [19/05/2005]
54. Parfit M. 2000. La búsqueda de los primeros americanos. *National geographic (España)*. Dic. Pag. 41-67.
55. Gobierno del Estado de México (2002) Hombre de Tepexpan. <http://www.edomexico.gob.mx/newweb/servicios/civica/pasajes/tepexpan.htm> [19/05/2005]
56. Instituto Latinoamericano De La Comunicación Educativa 2005. Mestizos y Castas. http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/act_permanentes/historia/histdel tiempo/mexicana/colonia/c_mos03.htm [19/05/2005]
57. Lisker R, Armendares S. 2001. Introducción a la Genética Humana. México: El Manual Moderno. 266 pp.
58. Servín M. 1999. "Estructura genética de la población mexicana". La Jornada 26 de abril <http://www.jornada.unam.mx/1999/04/26/cien-galeria.html> [19/05/2005]
59. "Chi square test for independence" GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95/NT GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.
60. Zhang J, Madden T. 1997. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 7:649-656.

61. Berman H, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, Shindyalov I, Bourne P. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28(1): 235-242.
62. Guex N, Peitsch, M. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
63. Pollastri G, McLysaght A. 2005. Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 21(8):1719-20.
64. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404-405.
65. Jones DT. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292:195-202.
66. Meiler J, Mueller M, Zeidler A, Schmaeschke F. 2001. JUFO: Secondary Structure Prediction for Proteins. *J Mol Model* 7(9):360-369.
67. Ouali M, King, R. 2000. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Prot Sci* 9:1162-1176.
68. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
69. Rost B, Yachdav G, Liu J. 2003. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Res* 32:321-326.
70. Cuff J, Clamp M, Siddiqui A, Finlay M, Barton G. 1998. Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server. *Bioinformatics* 14:892-893.
71. Wisconsin Package version 10.1. Genetics computer Group (GCG), Madison Wisc. 2000. Modulo PAUPSearch - Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.