

00559



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE
CYP2D6 EN UNA POBLACION UTILIZANDO
DXTROMETORFAN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOFARMACIA)

P R E S E N T A:

Q.F.B. KENNETH RUBIO CARRASCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HELGI JUNG COOK



277379

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F., 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

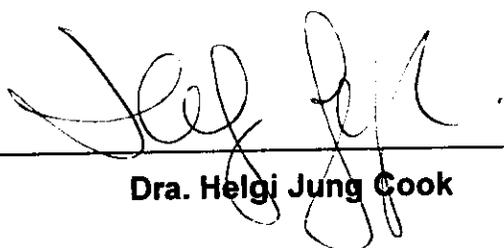
JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE	Dr. Francisco López Muñoz
PRIMER VOCAL	M en C. Dinorah Fabiola González Esquivel
SECRETARIO	M en C. Lourdes Mayet Cruz
PRIMER SUPLENTE	M en C. Inés Fuentes Noriega
SEGUNDO SUPLENTE	M en C. Liz Jannet Medina Reyes.

Sitio donde se desarrolló el tema:

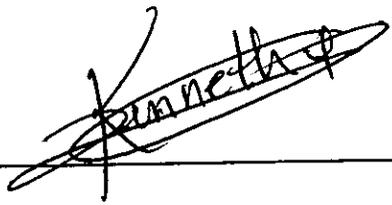
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

Asesor:



Dra. Helgi Jung Cook

Sustentate:



Q.F.B. Kenneth Rubio Carrasco.

Con todo mi cariño:

*A mis PADRES: Lic. Rafael Rubio Lara y
Profra. Refugio Carrasco García.*

*Por su cariño, educación, esfuerzo, apoyo, confianza y
libertad que siempre me han brindado.*

*A mis HERMANOS: Werner, Nesler y Shirley
por todo lo que hemos compartido y porque aunque somos tan
diferentes siempre estaremos juntos.*

*"Ninguna fuerza va a modelar, nuestro carácter, nuestra voluntad y nuestra
manera de ser, como no sea el hogar mismo".*

Agradezco infinitamente a:

A DIOS POR LA OPORTUNIDAD DE VIVIR.

Al jurado por el tiempo invertido, por sus críticas y comentarios

A la UNAM por seguir siendo la Máxima Casa de Estudios y darme la oportunidad de superarme profesional y personalmente .

A la dirección general de estudios profesionales de la UNAM, por la beca brindada durante mis estudios de maestría y darme la oportunidad de superarme profesionalmente.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por su formación y en especial a la Facultad de Química.

A NOVARTIS farmacéutica, al departamento de tecnología farmacéutica de la facultad y al Dr. Francisco Flores por los estándares donados.

Al INNN y a la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo invaluable en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Helgi Jun Cook, por la confianza que me brindó desde el primer momento, por ser mi asesora, una maestra excelente y una mujer ejemplar, y por guiarme en esta profesión tan linda, que es la Biofarmacia.

Al Profe. Juan por su apoyo y los buenos contactos.

A Liz, Nelly y Dinora por compartir sus conocimientos, por su orientación, paciencia, apoyo y regaños que me brindaron.

A los maestros de Biofarmacia por su enseñanza y consejos.

A mis voluntarios, por todo su apoyo y confianza y en especial a la comunidad SINALOENSE, sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.

A Delany por alegrar la familia.

A mi amiga-hermana Erika por todo lo vivido juntas, sé que cuento contigo siempre.

A Luis por estar siempre dispuesto a ayudarme, por todo lo compartido, por su confianza y su amistad.

A Julia, Alma, Vanessa y Lilian, por esa amistad que no esperaba, y espero que perdure por siempre.

A Don José, Sonia, Javier, Shi Jean, Gely, Carmen, Fausto, y Raúl por toda las molestias ocasionadas y su afecto.

Al Faustito por enojarse tan seguido conmigo.

A Juan Carlos, gracias por ser como eres y siempre contar contigo.

A todos mis amigos que no necesito nombrar, ellos saben quienes son, los quiero mucho y mil gracias.

¡ Si la lid del destino té derriba, dá una tregua pero no claudiques!



INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCION	2
II. GENERALIDADES	
2.1 Farmacogenética	4
2.2 Sistema enzimático del citocromo P450	5
2.3 Diferencias geográficas/interraciales en el polimorfismo oxidativo de fármacos.	7
2.4 Polimorfismo oxidativo de CYP2D6	11
2.4.1 Significado clínico del polimorfismo genético de CYP2D6	
2.5 Determinación del fenotipo metabolizador.	13
2.6 Monografía de dextrometorfán	14
2.6.1 Acción e indicaciones terapéuticas	
2.6.2 Propiedades físicas y químicas	
2.6.3 Farmacodinamia y farmacocinética	
2.6.4 Efectos adversos y secundarios	
2.6.5 Contraindicaciones	
2.6.6 Precauciones	
2.6.7 Formas farmacéuticas orales	
2.6.8 Dosis	
2.7 Métodos analíticos para la determinación de dextrometorfán (DM) y dextrorfán (DT) en fluidos biológicos.	17
III METODOLOGIA	
3.1 Reactivos y materiales	20
3.1.1 Reactivos	
3.1.2 Estándares	
3.1.3 Equipo	
3.2 Método analítico para la cuantificación de DM y DT en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución.	20
3.2.1 Preparación de las soluciones	
3.2.1.1 Solución patrón de DM	
3.2.1.2 Solución patrón de DT	
3.2.1.3 Solución metanólica de clomipramina	
3.2.1.4 Solución enzimática de β -glucuronidasa	
3.2.2 Fase móvil	
3.2.3 Preparación de la curva patrón en orina	





3.2.4 Procedimiento para cuantificar dextrorfán total en orina	
3.2.5 Procedimiento para cuantificar dextrorfán libre y dextrometorfán en orina	
3.2.6 Condiciones cromatográficas	
3.3 Validación del método analítico para la cuantificación de DM y DT en orina	25
3.3.1 Linealidad del sistema	
3.3.2 Linealidad del método	
3.3.3 Repetibilidad y reproducibilidad	
3.3.4 Especificidad	
3.3.5 Exactitud	
3.3.6 Límite de detección y cuantificación	
3.3.7 Porcentaje de recobro	
3.3.8 Estabilidad	
3.3.8.1 Estabilidad bajo ciclos congelación/descongelación	
3.3.8.2 Estabilidad de las muestras procesadas	
3.4 Estudio del fenotipo metabolizador en voluntarios sanos	27
3.4.1 Producto comercial utilizado en el estudio	
3.4.2 Voluntarios	
3.4.2.1 Criterios de exclusión	
3.4.3 Protocolo de estudio	
3.4.4 Consideraciones éticas	
3.4.5 Análisis de los resultados	
IV RESULTADOS	
4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de DM y DT en orina.	31
4.1.1 Linealidad del sistema	
4.1.2 Linealidad del método	
4.1.3 Repetibilidad y reproducibilidad	
4.1.4 Especificidad	
4.1.5 Exactitud	
4.1.6 Límite de detección y cuantificación	
4.1.7 Porcentaje de recobro	
4.1.8 Estabilidad	
4.2 Estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6	41
V DISCUSION	
5.1 Validación del método analítico para cuantificar DM y DT en orina por CLAR	46
5.1.1 Linealidad del método	
5.1.2 Repetibilidad y reproducibilidad	





Indice general

5.1.3	Especificidad	
5.1.4	Exactitud	
5.1.5	Límite de detección y de cuantificación	
5.1.6	Porcentaje de recobro	
5.1.7	Estabilidad	
5.2	Estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6	
VI	CONCLUSIONES	53
VII	APENDICES	55
VIII	BIBLIOGRAFIA	59





INDICE DE TABLAS

	Pág
2.1 Principales enzimas metabolizadoras de fase I y fase II en el hígado humano.	6
2.2 Algunas variaciones determinadas genéticamente que afectan la farmacocinética de algunos fármacos.	9
2.3 Diferencia de fenotipos de hidroxilación tipo debrisoquina en poblaciones caucásicas y orientales.	10
2.4 Sustratos de CYP2D6	12
2.5 Fármacos sustratos para establecer fenotipos de citocromos P450s.	14
2.6 Métodos de CLAR para la determinación y cuantificación de Dextrometorfán y dextrorfán.	18
3.1 Preparación de la curva patrón conteniendo dextrometorfán y dextrorfán en orina.	22
4.1 Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrometorfán en metanol.	31
4.2 Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrorfán en metanol.	31
4.3 Linealidad del método para la cuantificación de DM en orina.	33
4.4 Linealidad del método para la cuantificación de DT en orina.	33
4.5 Repetibilidad del dextrometorfán	35
4.6 Repetibilidad del dextrorfán.	35
4.7 Reproducibilidad del dextrometorfán.	36
4.8 Reproducibilidad del dextrorfán.	36
4.9 Exactitud del método analítico.	38
4.10 Límite de detección y de cuantificación para DM y DT.	38
4.11 Porcentaje de recobro en muestras urinarias adicionadas con DM y DT.	39
4.11 Estabilidad de DM con ciclos congelación/descongelación.	40
4.12 Estabilidad de DT con ciclos congelación/descongelación.	40
4.13 Estabilidad de DM en muestras procesadas.	41
4.14 Estabilidad de DT en muestras procesadas.	41
4.15 Resultados del fenotipo metabolizador en voluntarios sanos.	43
4.16 Resultados del estudio para determinar el fenotipo metabolizador.	44





INDICE DE FIGURAS

	Pág.
2.1 Esquema de los cuatro citocromos más importantes para la oxidación de fármacos.	8
2.2 Esquema simplificado de la evolución de las tres principales razas.	10
2.3 Estructuras químicas y vías metabólicas del dextrometorfán.	15
3.1 Diagrama del método de extracción para la cuantificación de dextrorfán total y dextrometorfán en orina.	24
4.1 Linealidad del sistema para la cuantificación de DM en metanol.	32
4.2 Linealidad del sistema para la cuantificación de DT en metanol.	32
4.3 Linealidad del método para cuantificar DM en orina.	34
4.4 Linealidad del método para cuantificar DT en orina.	34
4.5 Cromatograma sobre la especificidad del método.	37
5.1 Cromatograma de voluntarios.	50
5.2 Distribución de metabolizadores pobres y metabolizadores extensos.	52





RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el fenotipo metabolizador predominante en una población utilizando dextrometorfán. En este estudio participaron 43 voluntarios sanos, quienes firmaron su consentimiento de participación por escrito, 16 hombres y 27 mujeres de los cuales 6 eran fumadores. A los voluntarios se les administraron 20 mL de dextrometorfán (jarabe) por vía oral y se colectó la orina durante las 8 horas posteriores a la administración. Las concentraciones de dextrometorfán y su principal metabolito dextrorfán en orina, se cuantificaron utilizando un método por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector U.V. Con base en el criterio de que una proporción dextrometorfán/dextrorfán mayor a 0.3 corresponde a un metabolizador pobre y una proporción dextrometorfán/dextrorfán menor a 0.3 a un metabolizador rápido se encontró que de los 43 voluntarios, solamente 1 presentó el fenotipo de metabolizador pobre, lo que correspondió a una frecuencia de 2.3%, la cual es más baja que la frecuencia encontrada en caucásicos americanos y europeos que es de 3.9 a 10% y mayor que el obtenido en poblaciones orientales, que es de 1%. Será necesario aumentar el tamaño de la población para obtener resultados estadísticamente válidos y de esta manera contar con información acerca de la proporción de metabolizadores pobres en nuestro país.





I. Introducción





INTRODUCCION

Una de las principales causas de la variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas o sanguíneas de un fármaco es la variabilidad en el metabolismo del mismo. En algunas poblaciones se encuentran individuos que metabolizan más lentamente o más rápidamente que el promedio de la población.

En diversos estudios se ha encontrado que los factores genéticos contribuyen sustancialmente en la depuración metabólica de fármacos y por ello se inició una nueva área de investigación conocida como farmacogenética; la cual estudia las variaciones hereditarias en la respuesta a un fármaco.

Existen diferentes sistemas enzimáticos que son susceptibles a presentar polimorfismo genético, entre los que se encuentran, el CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2, los cuales son responsables del metabolismo de un gran número de fármacos como son: antiarrítmicos, β -bloqueadores adrenérgicos, antihipertensivos, neurolépticos, antidepresivos tricíclicos y antitusivos, entre otros.

Se ha llevado a cabo estudios en diferentes poblaciones en los que se ha determinado el fenotipo metabolizador de CYP2D6, por ejemplo, se ha reportado que la frecuencia de metabolizadores pobres en caucásicos es de un 5 a 10%, mientras que en orientales chinos es de 1%. A la fecha no existe información concerniente a la población mexicana, por lo que se llevó a cabo este trabajo cuyo objetivo fue, determinar el fenotipo metabolizador de CYP2D6 predominante en una población, utilizando dextrometorfán.





II. Generalidades





2.1 Farmacogenética

La variabilidad interindividual en la respuesta de un fármaco administrado en la misma dosis puede deberse a factores genéticos y/o ambientales, los cuales pueden alterar la absorción, distribución, excreción y principalmente el metabolismo de un fármaco.¹ Aproximadamente hace 40 años se reconoció que ciertas reacciones adversas de fármacos se deben a variaciones en la actividad enzimática.² Una disminución en la velocidad del metabolismo de fármacos puede derivar en un incremento en la incidencia de efectos adversos. Inversamente, un incremento en la velocidad del metabolismo de fármacos puede dar lugar a una reducción de la respuesta terapéutica, por lo que es importante entender los factores que influyen en los requerimientos de dosificación de fármacos e identificar a aquellos individuos susceptibles en una población. Así la identificación de las alteraciones en el metabolismo de fármacos pueden apoyar a la planeación de un régimen terapéutico.¹

El estudio de las variaciones hereditarias en la respuesta a un fármaco se denomina *farmacogenética*.³

De acuerdo a Lennard y cols.,⁴ "La mayoría de los factores innatos que afectan la respuesta a fármacos se deben a alteraciones en la actividad funcional de una enzima... Estos factores innatos son de dos tipos: algunos son muy raros solamente 1 en 10 000 ó 1 en 100 000 de la población podría estar afectada, mientras que otros toman la forma de clásicos polimorfismos genéticos. Un polimorfismo farmacogenético es un rasgo monogénico causado por la presencia en la misma población de más de un alelo en el mismo locus y más de un fenotipo con respecto a la interacción de un fármaco con el organismo. La frecuencia del gen anormal es mayor del 1% en la población general".⁴

Cuando la actividad farmacológica de un fármaco está relacionada con la actividad catalítica de una enzima específica, los factores que influyen en la actividad de la enzima podrían afectar la respuesta clínica del agente. Las enzimas responsables de la actividad y metabolismo de fármacos y otros compuestos en el ser humano muestran una amplia variabilidad interindividual en su expresión proteínica ó actividad catalítica, resultando en fenotipos metabólicos de fármacos. Ésta variación puede deberse a la inhibición e inducción de las enzimas ó bien a mutaciones genéticas ó delección de gen. Cuando se presentan condiciones genéticas específicas ó delecciones dentro de una población se dice que el gen es polimórfico ó tiene múltiples formas.⁵





Desde 1953, se ha observado un incremento en polimorfismos genéticos en las enzimas que metabolizan a los fármacos, entre las que se encuentran la N-acetiltransferasa, S-metiltransferasa, y más recientemente la familia de enzimas del citocromo P450.

El polimorfismo genético se relaciona con tres fenotipos: el metabolismo extenso de un fármaco (EM)* es característica de la población normal; mientras que el metabolismo pobre (PM)* está asociado con acumulación de fármacos ó sustratos específicos y es típicamente un rasgo autosómico recesivo lo cual requiere de mutación y/o delección de ambos alelos para expresarse fenotípicamente; y el metabolismo ultraextenso (UEM)* que resulta de un incremento en el metabolismo de fármaco y es un rasgo autosómico originado por amplificación genética.⁶

2.2 Sistema enzimático del citocromo P450

Las enzimas envueltas en el metabolismo de fármacos se clasifican en reacciones de fase I (oxidativas) y reacciones de fase II (conjugativas); éstas reacciones pueden ser complementarias entre sí. Por ejemplo, las reacciones de fase I como oxidación, reducción e hidrólisis, generan grupos funcionales que podrían servir subsecuentemente como sitios de conjugación para ácido glucorónico, sulfato, ó glutatión, catalizados por enzimas hepáticas de fase II.⁷ En la **Tabla 2.1** se presentan las principales enzimas que forman parte de las reacciones de fase I y fase II encontradas en el hígado humano.

El sistema enzimático del citocromo P450 (o más apropiadamente, hemo-tiolato P450s) es el grupo más importante en las reacciones de fase I y representa una superfamilia de enzimas que cataliza el metabolismo de muchos compuestos endógenos y compuestos exógenos.²

El citocromo P450 se denomina así porque en estado reducido y en presencia de monóxido de carbono presenta un espectro de absorción cuyo máximo se presenta a 450 nm.⁸

* Por sus siglas en inglés, Poor Metabolizers (PM), Extensive Metabolizers (EM) and Ultraextense Metabolizers (UEM).





El citocromo P450 está compuesto de un grupo de enzimas o isoenzimas localizadas en el retículo endoplásmico de hepatocitos.⁹ El citocromo P450 es particularmente abundante en el hígado, pero las enzimas se expresan también en otros tejidos, tales como mucosa gástrica, pulmones, cerebro y riñones.¹⁰

Tabla 2.1 Principales enzimas metabolizadoras en fase I y fase II en el hígado humano.

Fase I	Fase II
CYP1A2	Glutación S-transferasa*
CYP2A6	N-acetiltransferasa*
CYP2B	UDP-glucoronosilotransferasa*
CYP2C19*	Sulfotransferasa
CYP2D6*	
CYP2E1*	
CYP3A*	
NADPH-quinona	
Oxidoreductasa*	

*Enzimas que se conoce que exhiben polimorfismo genético en humanos

Cada isoenzima P450 es el resultado de un gen separado. Se han identificado más de 200 genes de citocromo P450,¹¹⁻¹² pero su contribución al metabolismo de fármacos ha sido difícil de entender debido a la baja especificidad del sustrato. En el hígado humano se han identificado un mínimo de 12 enzimas P450 distintas que participan en la activación del oxígeno molecular para su incorporación dentro de una amplia formación de sustratos lipofílicos.¹³

En 1987, con el fin de unificar criterios relacionados a la superfamilia P450, un grupo de investigadores estableció una nomenclatura, la cual, agrupa a los citocromos P450s dentro de "familias", cuyos miembros tienen más de un 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos.¹⁴ Los miembros de una subfamilia presentan más de un 55% de similitud en la secuencia de aminoácidos. En este sistema de nomenclatura, el prefijo CYP es utilizado para designar al sistema de citocromo P450¹⁵ y se designa con un número arábigo, comenzando con el 1 para las familias del gen; por ejemplo, las enzimas hepáticas primarias metabolizadoras de fármacos están comúnmente agrupadas en cuatro familias designadas del 1 al 4. Los P450 extrahepáticos involucrados en la síntesis de esteroides pertenecen a las familias 18, 19 y 21.





Las subfamilias se representan con letras mayúsculas secuenciales y los genes individuales dentro de la subfamilia son denotados por números arábigos secuenciales después de la letra. Existen 8 subfamilias en la familia P450 del gen 2, designadas con la letra A a la H y la siguiente subfamilia a descubrir deberá denotarse con la letra I. Los genes individuales se numeran dependiendo de la secuencia de datos publicados.¹⁶

Existen cuatro enzimas P450 particularmente importantes para la psicofarmacología: CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4. En la Fig. 2.1 se presenta un esquema de los cuatro citocromos con algunas de sus características más importantes.¹⁰

Se ha encontrado una variabilidad interindividual en la expresión hepática de enzimas P450.¹⁷⁻¹⁸ y para un individuo, la velocidad de depuración metabólica de un compuesto está en función del fenotipo. De las enzimas involucradas el CYP2C19 y el CYP2D6 se expresan polimórficamente. A la fecha la expresión polimórfica de CYP1A2 no ha sido establecida claramente.¹⁹ En la Tabla 2.2 se muestran algunas variaciones determinadas genéticamente que afectan la farmacocinética de algunos fármacos.²⁰

2.3 Diferencias Geográficas/interraciales en polimorfismo oxidativo de fármacos.

La terapia farmacológica puede estar influenciada por las diferencias interétnicas debidas tanto a factores intrínsecos, como a factores extrínsecos. Entre estos últimos se encuentran los alimentos y el medio ambiente, entre los factores intrínsecos se incluyen, la edad, la función orgánica y algunas enfermedades específicas. Sin embargo, probablemente el principal factor intrínseco es la variación genética de enzimas metabolizadoras de fármacos y además receptoras de polimorfismo genético y traductoras de señal. No solamente se encuentran diferencias entre razas sino que, también hay una gran diversidad genética dentro de una misma población. Un ejemplo típico de enzima que muestra metabolismo polimórfico es CYP2D6, la cual presenta una falta de actividad enzimática en cerca de un 7% de los habitantes de Europa central, pero solamente de 1-2% en poblaciones europeas del oriente. Desde otro punto de vista, la duplicación de genes base del metabolismo ultrarápido se observa en solamente un 2% de los habitantes de Europa central por un 29% en etíopes.²² Es por ello que hay ciertas limitantes para extrapolar datos clínicos a diferentes poblaciones.²¹





Generalidades

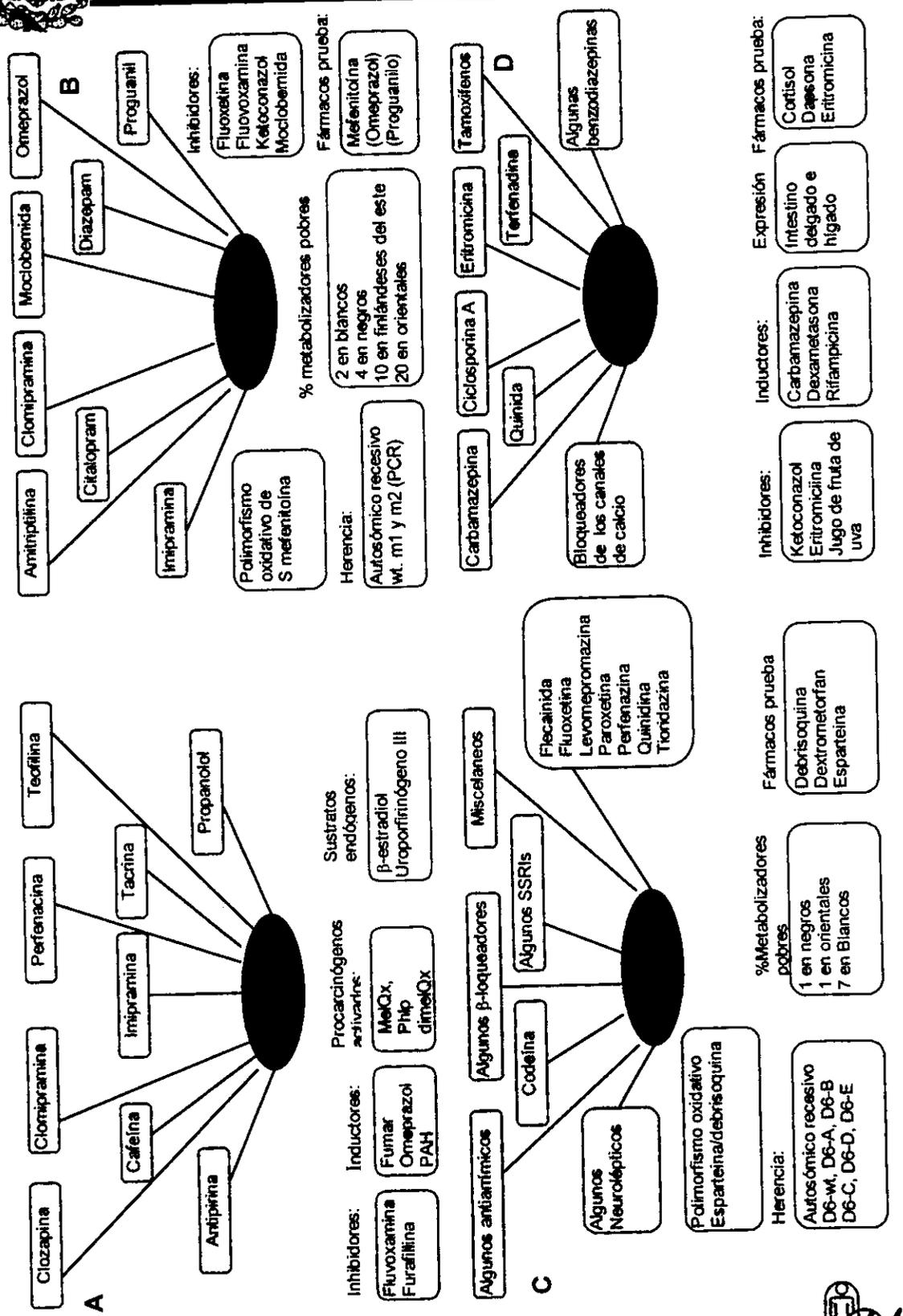


Fig. 2-1. Los cuatro citocromos P450s más importantes para la oxidación de fármacos: citocromo P4501A2(CYP1A2) (A), CYP2C19 (B), CYP2D6 (C) y CYP3A4 (D), diMeIQx, 2-amino-3,4,8-trimetilimidazol [4,5-*f*]quinoxalina; MeIQx,2-amino-3,8-dimetilimidazol [4,5-*f*]quinoxalina; PhIP,2-amino-1-metil-6-fenil-imidazol[4,5-*b*]pirridina; PAH, hidrocarburos aromáticos policíclicos.¹⁰





Tabla 2.2 Algunas variaciones determinadas genéticamente que afectan la farmacocinética de algunos fármacos

CONDICION/ PROTOTIPO	CONSECUENCIA CLINICA CON EL PROTOTIPO	ENZIMA ENVUELTA	FRECUENCIA DE METABOLIZADO R POBRE	FARMACOS SUBSTRATOS
Hidroxilación pobre y extensa de debrisoquina	Metabolizador pobre podría mostrar toxicidad	CYP2D6	5-10%- Caucásicos 3-8% Negros 0.9% Orientales 1% Arabes	Ecaínida, flecaínida, bufurolool, timolol, codeína, nortriptilina, metoprolol, dextrometorfan, esparteína ferhexilina.
Hidroxilación pobre y extenso de S-mefenitoína	Metabolizadores pobres podría mostrar sedación.	CYP2C(18)	3-5% Caucásicos 16% Orientales	Diazepam
S-metilación de o- mercaptopurina, pobre y extenso	Metiladores rápidos podría mostrar alto riesgo de falla terapéutica.	?	14% Caucásicos, lenta metilación.	Azatioprina
Acetilación lenta y rápida de isoniazida	Acetiladores lentos podrían mostrar toxicidad	N-acetiltransferasa (NAT2)	60% Caucásicos 10-20% Orientales y esquimales.	Acido p-aminosalicílico, amrinona, aminoglutetiimida, clonazepam, dapsona, hidrazalina, fenelzina, procainamida, promizola, sulfametazina, sulfasalazina.
Hidrólisis lenta de succinilcolina	Apnea prolongada	Colinesterasa en plasma	Severos genes anormales, el más común desorden 1 en 2500	Succinilcolina

Desde un punto de vista evolutivo, existen 5 razas, dos de las cuales representan pequeñas poblaciones: los Bushmen de Africa y los Aborígenes Australianos. Las 3 grandes razas son los Caucásicos, Mongoloides y Negroides.²² Se ha investigado la evolución de estas 3 razas utilizando estudios de lenguaje y varias mediciones biológicas, encontrándose que la separación de caucásicos de los mongoloides ocurrió hace alrededor de 40 000 a 60 000 años.²³ La Fig. 2.2. muestra un diagrama simplificado de la evolución de las tres principales razas, basándose en la comparación de un gran número de proteínas y grupos sanguíneos en poblaciones.²⁴





Generalidades

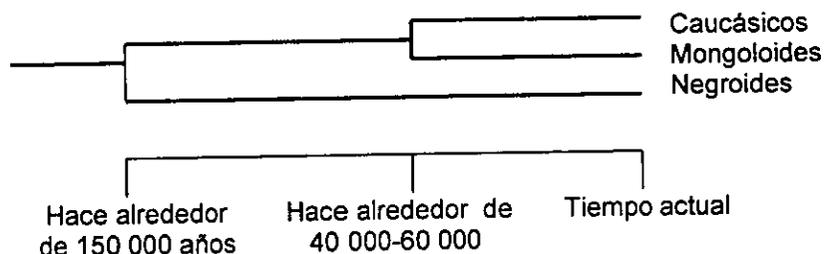


Fig.2.2 Esquema simplificado de la evolución de las tres principales razas.

En al **Tabla 2.3** se muestran las diferencias interétnicas en la hidroxilación de la debrisoquina en poblaciones orientales y poblaciones caucásicas. En la tabla se puede observar que la incidencia del fenotipo metabolizador pobre (PM) en caucásicos es de 5-10%, mientras que en 100 sujetos japoneses no se observó ningún metabolizador pobre.¹

Tabla 2.3 Diferencia de fenotipos de hidroxilación tipo debrisoquina en poblaciones caucásicas y orientales.

Grupo étnico	No. de voluntarios	Metabolizadores pobres	
		No.	%.
Caucásicos			
Británicos	258	23	9
Daneses	301	22	7
Húngaros	100	10	10
Suecos	757	41	5.4
Chinos	695	7	1
Orientales Canadienses	13	4	31
Japoneses	100	0	0





2.4 Polimorfismo oxidativo de CYP2D6.

El CYP2D6 es la enzima que caracteriza mejor la expresión polimórfica de las enzimas del citocromo P450 en humanos. La debrisoquina se utilizó como estándar para fenotipar el polimorfismo en estudios clínicos, encontrándose a individuos metabolizadores extensos (EM), metabolizadores pobres (PM) e individuos metabolizadores ultraextensos (UEM). Actualmente se han utilizado otros fármacos para establecer el fenotipo metabolizador, entre los que se encuentran esparteína, dextrometorfán, y más recientemente propafenona.

Se ha observado que la O-desmetilación de dextrometorfán (DM) a dextrorfán (DT) es un método relativamente seguro y útil para determinar el fenotipo de CYP2D6 in vivo²⁵ e in vitro.²⁶

2.4.1 Significado clínico del polimorfismo genético de CYP2D6.

Existen ciertos casos en los cuales es importante conocer el polimorfismo genético: cuando la cinética de un principio activo depende significativamente de una enzima específica y/o cuando la variabilidad farmacocinética es de importancia clínica.²⁷ En el caso de que esta variabilidad farmacocinética se presente en un fármaco con estrecho índice terapéutico, conocer el polimorfismo genético podría emplearse en el ajuste de dosis del fármaco.²⁸

En base en los criterios arriba mencionados, se ha encontrado que el polimorfismo de CYP2D6 es de significancia clínica para antidepresivos tricíclicos, ciertos neurolépticos y antiarrítmicos.²⁹ La **Tabla 2.4** enlista los sustratos clínicamente importantes de CYP2D6 y cuyo uso podría formar una base para los requerimientos del análisis farmacogenético.⁵





Tabla 2.4 Sustratos de CYP2D6

Antiarrítmicos	Antidepresivos	β -bloqueadores	Neurolépticos	Misceláneos
Amiodarona	Imipramina	Propranolol	Perfenazina	Codeína
Encainida	Desipramina	Timolol	Thioridazina	Debrisoquina
Flecainida	Amitriptilina	Bufuralol		4-OH
Mexilitina	Nortriptilina	Metoprolol		anfetamina
N-propilamalina	Clomipramina			Indoramin
Propafenona				Fenformin
Esparteína				

En el caso de los antidepresivos tricíclicos, tanto los individuos que presentan el fenotipo metabolizador pobre (PM) como aquellos que presentan el fenotipo metabolizador ultraextenso (EUM) de CYP2D6 pueden ser candidatos a presentar reacciones adversas. Los individuos PM con dosis normales pueden desarrollar concentraciones plasmáticas tóxicas, mientras que la administración de sustratos de CYP2D6 a individuos UEM puede dar lugar a una falla terapéutica debido a que las concentraciones plasmáticas de fármaco en dosis normales son bajas.³⁰ Aunque sí bien estos pacientes pueden ser tratados exitosamente con dosis más altas, los metabolitos provenientes de las vías metabólicas alternas podrían acumularse y contribuir a la toxicidad. Las manifestaciones clínicas de pacientes UEM y PM tratados con antidepresivos son a veces similares, lo que lleva a confusión en la comprensión de las bases para las reacciones adversas. Debido a la falta de individualización de la dosis los pacientes están propensos a episodios recurrentes de depresión y podrían no responder al tratamiento.³⁰⁻³¹ Sin embargo, la relación entre la dosis y la respuesta terapéutica podría estar dirigida a través de monitoreos terapéuticos de fármacos (TDM)* y después de conocer el metabolismo de un fármaco, a través de técnicas de fenotipación, podrían predecirse los resultados y permitir un ajuste de dosis apropiado para prevenir los efectos adversos.³²⁻³³ Los pacientes que requieren tratamiento con antidepresivos ó antipsicóticos, los cuales son sustratos de CYP2D6, pueden iniciar el régimen terapéutico normal, debido a que las vidas medias de eliminación de estos fármacos son largas, las concentraciones tóxicas pueden tomar de 5 a 7 semanas a desarrollarse, mientras se obtienen los resultados de fenotipación, y los ajustes de dosis ó selección de la terapia pueden hacerse una vez que los datos estén disponibles. En este caso, el conocimiento del fenotipo de CYP2D6 podría asistir en la anticipación de efectos tóxicos ó en la selección apropiada de una terapia alternativa sobre la base del conocimiento del metabolismo alternativo de fármacos.⁵

* Por sus siglas en inglés Therapeutic Drug Monitoring





2.5 Determinación del fenotipo metabolizador

Se ha propuesto que se puede establecer el fenotipo metabolizador de un individuo basándose en las concentraciones urinarias del fármaco y su metabolito, después de la administración de una dosis determinada de un marcador. Ello es particularmente útil para predecir el régimen de dosificación de un fármaco aún si su índice terapéutico es estrecho. Las características ideales de un marcador son: 1) seguridad en un amplio rango de poblaciones; 2) de fácil administración, muestreo y análisis; 3) reproducibilidad en la asignación del fenotipo y 4) un alto grado de especificidad para la enzima de interés.⁴

A pesar de su importancia la determinación del fenotipo metabolizador no se lleva a cabo con frecuencia en la clínica, por varias razones. Una es la inconveniencia de la toma del marcador y la colección de orina, otra es el costo del ensayo, y otro más es la posibilidad de falsos positivos debido a otros fármacos que se administran concomitantemente. La fenotipación basada en el análisis de DNA de sangre y otros tejidos, promete proveer un acceso hacia la predicción del genotipo metabolizador.⁴ En la **Tabla 2.5** se presentan los fármacos sustratos para establecer el fenotipo de citocromos P450s.⁵





Tabla 2.5 Fármacos sustratos para establecer fenotipos de citocromos P450s.

CYP	Fármaco prueba y producto	Criterio de asignación del fenotipo
CYP2D6	Debrisoquina→4-hidroxi-debrisoquina; Dextrometorfán→dextrorfán; Esparteína→2-y -dehidroesparteína	PM= MR ≥12.6, UEM = MR ≤ 0.5 PM= MR ≥ 0.3 PM= MR ≥0.2
CYP2C19	Mefenitoína→log ₁₀ [S-mefenitoína (dosis)]/4'-OH- mefenitoína (orina); Mefenitoína→S-mefenitoína urinaria/ mefenitoína urinaria; Omeprazol →log ₁₀ omeprazol/5'- hidroxiomeprazol (plasma)	PM= log Índice hidroxilación ≥ 1.0 R- PM=proporción S/R ≥ 1.0 PM = Índice de hidroxilación ≥ 1.0
CYP2E1	Clorozoxazona→Clorozoxazona (dosis)/6- OH-clorozoxazona (orina 8-h)	PM= indefinido
CYP3A4	Eritromicina→ ¹⁴ CO ₂ recobro en aliento seguido por administración I.V. de ¹⁴ C-N-metileritromicina; Dapsona→hidroxilamina dapsona→ dapsona + dapsona hidroxilamina	PM= indefinido PM=indefinido

PM. Metabolizador pobre
UEM Metabolizador ultraextenso
MR Proporción metabólica*

2.6 Monografía de dextrometorfán

El dextrometorfán es un agente antitusivo no narcótico ampliamente utilizado y efectivo.³⁴ Después de su administración oral en humanos se metaboliza ampliamente a dextrorfán (3-hidroxi-17metilmorfina), 3-hidroximorfina, 3-metoximorfina, y conjugados en la posición del grupo 3-hidroxilo.³⁵⁻³⁹ Se ha reportado una gran variabilidad interindividual en el metabolismo de dextrometorfán³⁴ y ahora se conoce que el metabolismo de este fármaco está bajo el mismo control genético que el polimorfismo oxidativo de debrisoquina.³⁷⁻⁴³ En la Fig.2.3 se ilustran las estructuras y vías metabólicas del dextrometorfán.

* Por sus siglas en inglés Metabolic Ratio (MR)





La O-desmetilación de dextrometorfán a dextrorfán se lleva a cabo por el CYP2D6,^{25,44} mientras que la formación de 3-metoximorfina y 3-hidroximorfina, se lleva a cabo en menor proporción también por CYP2D6 y CYP3A3/4, respectivamente.⁴⁴

Dado a su perfil de seguridad y a que con una dosis única se logra una distinción aparente de los fenotipos, se ha sugerido que el dextrometorfán puede ser un fármaco de prueba superior para identificar individuos con deficiencias en la oxidación de fármacos del tipo debrisoquina.^{41,43,45}

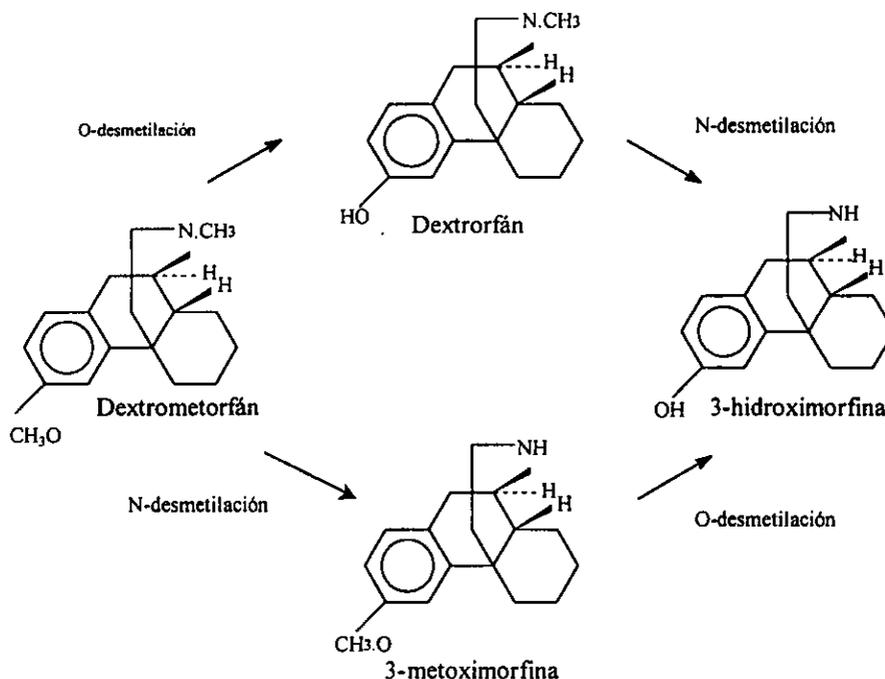


Fig. 2.3 Estructuras químicas y vías metabólicas del dextrometorfán.

2.6.1 Acción e indicaciones terapéuticas

El bromhidrato de dextrometorfán, es un fármaco exclusivamente antitusivo que a diferencia de los opiáceos y sucedáneos no produce efectos narcóticos ni adicción. Su acción farmacodinámica la ejerce directamente sobre el centro de la tos. Por su rápido y eficaz efecto sintomático es un valioso complemento en el tratamiento de las afecciones respiratorias de origen bacteriano.⁴⁶





2.6.2 Propiedades físicas y químicas

Origen: Dextroisómero metilado del levorfanol.

Grupo químico: Derivado no opiáceo del morfinano.

Nombre químico: Morfinano, 3-metoxi-17-metil-, (9 alfa, 13 alfa, 14 alfa)-bromhidrato, monohidratado.

Fórmula empírica: $C_{18}H_{25}NO \cdot HBr \cdot H_2O$.

Peso molecular: 370.33.

Descripción: Polvo cristalino o cristales prácticamente blancos, con un olor débil. Funde, con descomposición, a los $126^{\circ}C$ aproximadamente.

Solubilidad: Muy soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol.

2.6.3 Farmacodinamia y farmacocinética

Su mecanismo de acción es suprimir el reflejo de la tos mediante un efecto directo sobre el centro de la tos del bulbo raquídeo. Administrado por vía oral el dextrometorfán se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal de donde pasa para su biotransformación al hígado mediante N-dealquilación y/o desmetilación. El dextrometorfán tiene un inicio de acción rápida, observándose ésta a los 20 ó 30 minutos de su ingestión. Cerca del 50% de la dosis se excreta como dextrorfan en la orina de 6 horas y menos del 1% se elimina por las heces.⁴⁷

2.6.4 Efectos adversos y secundarios.

A dosis terapéuticas no se presenta ninguna reacción adversa y/o secundaria; a dosis muy por arriba de lo recomendado podría ocasionar náuseas, irritación gástrica y vómito. En algunos casos se presenta excitación, confusión mental, somnolencia, depresión del sistema nervioso y dificultad intensa para respirar, y resequead de boca.

2.6.5 Contraindicaciones

Gastritis, úlceras pépticas, depresión e insuficiencia respiratoria ó hipersensibilidad al medicamento.

2.6.6 Precauciones

Debe usarse con precaución en los siguientes cuadros clínicos: asma y deterioro de la función hepática. No se han reportado problemas por el uso de dextrometorfán durante el embarazo y la lactancia, sin embargo, el médico debe considerar la relación riesgo-beneficio.⁴⁶





2.6.7 Formas farmacéuticas orales

Bromhidrato de dextrometorfán. Tabletas de disolución bucal.

Bromhidrato de dextrometorfán. Jarabe

Bromhidrato de dextrometorfán Comprimidos masticables.

Dextrometorfán, polistirex. Suspensión oral de liberación prolongada.

2.6.8. Dosis

Adultos: Oral de 10 a 20 mg cada cuatro horas o 30 mg a intervalos de seis a ocho horas dependiendo de la necesidad. La prescripción usual límite para adultos es de 120 mg al día.

Niños: La dosis usual para niños de 2 a 6 años es de 2.5 a 5 mg cada cuatro horas y para niños de 6 a 12 años: oral de 5 a 10 mg cada cuatro horas o 15 mg a intervalos de seis a ocho horas, dependiendo de la necesidad.⁴⁷

2.7 Métodos analíticos para la determinación de dextrometorfán y dextrorfán en fluidos biológicos.

Se han reportados diferentes métodos analíticos para la cuantificación de dextrometorfán y/o dextrorfán en fluidos biológicos, entre los que se incluyen espectrometría de fluorescencia,⁴⁸ radioinmunoanálisis,⁴⁹ cromatografía de gases-líquido,^{36,50,51} cromatografía de líquidos de alta resolución⁵²⁻⁵⁷ y cromatografía de capa fina,⁵⁸ De ellos, los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución han sido los más utilizados por el tiempo de análisis, la alta sensibilidad del equipo, y los métodos de extracción sencillos. En la **Tabla 2.6** se describen algunos métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución empleados en la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán y que han sido previamente publicados.





Tabla 2.6 Métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación y cuantificación de dextrometorfán y dextrotrófán.

Columna	Fase móvil	Detector	Longitud de onda del detector (nm)	Tiempo total de análisis (min.)	Solvente utilizado en la extracción	Ref.
Spherisorb-fenil; 5µm	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01 M, ajustado a pH de 4.0 con ác. Fosfórico al 8.5% (45:55)	Ultravioleta	280	15 min.	Hexano y alcohol n-butílico	54
Novapak phenyl; 15 x 0.46 cm	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01 M, ajustado a pH de 4.0 con ác. Fosfórico al 8.5% (40:60).	Ultravioleta Fluorescencia	U.V. a 484 Fluorescencia a 280 y 310.	10 min.	Hexano:butanol (95:5)	59
Selectosil (phenomenex) 4.6µm x 150 mm	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01 M, ajustado a pH de 3.0. (30:70)	Fluorescencia	305 y 280	20 min.	10 mL de hexano con tiretilamina al 0.1%	60
Spherisorb-CN (150 x 9.6 mm)	Acetonitrilo:agua:triethylamina (6:93.88:6.12)	Ultravioleta Fluorescencia	U.V. a 280 Fluorescencia a 275 y 302	20 min.	Eter:cloroformo:propanol-2	61
Licosphera 60-P-Select B; 250 x 4 mm, 5µm, MERCK	Acetonitrilo:agua:triethylamina (33:66:1)	Fluorescencia	230 y 307	10 min.	n-hexano:alcohol n-butílico (90:10)	62
Novapak CN, HP Radial-pak 100 x 8 mm	Acetonitrilo:acetato de sodio 0.01M con 600 µL de triethylamina	Fluorescencia	190-235	20 min.	Hexano:acetato de etilo (50:50)	63





III. Metodología





3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

3.1.1 Reactivos

Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt
Diclorometano grado R.A., Mallinckrodt
Fosfato monobásico de potasio R.A., Técnica química Lote 31
Carbonato de sodio R.A., J.T. Baker. Lote E48163
Metanol R.A., J.T. Baker.
Enzima β -glucuronidasa Tipo HP-2, (97,200 unidades/mL), SIGMA. Lote 97H3781

3.1.2 Estándares

Clomipramina (Estándar interno E.I), donado por NOVARTIS, Farmacéutica.
Dextrometorfán.(DM), donado por el laboratorio de tecnología farmacéutica, UNAM
Tartrato de dextrorfán, (DT), Research Biochemical International. RBI, Lote 10 CM-IX-13.

3.1.3 Equipo

Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard, equipado con bomba cuaternaria modelo HP 1050, inyector manual modelo HP 1050 y detector de U.V de longitud de onda variable, modelo HP 1050. Loop de 100 μ L.
Columna Spherisorb de fenilo de Waters, 4.6 x 250 mm, 5 μ m de I.D.
Baño de ultrasonido modelo BRANSONIC PC-620
Centrifuga BECKMAN PJ-6
Balanza Analítica SARTORIUS modelo 1800
Agitador Vortex Thermolyne 16700.
Agitador horizontal ORBIT

3.2 Método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en orina por CLAR.

El método analítico utilizado fue el reportado por Young Han Park y cols., en 1984⁵⁴ con algunas modificaciones.

3.2.1. Preparación de las soluciones





3.2.1.1 Solución patrón de dextrometorfán

En un matraz volumétrico de 50 mL, se colocaron 5 mg del estándar de bromhidrato de dextrometorfán, se disolvió con metanol y se llevó al aforo con el mismo solvente, obteniéndose una concentración de 100 µg/mL.

3.2.1.2 Solución patrón de dextrorfán

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 25 mg de dextrorfán, disolviendo en metanol y llevando al aforo con el mismo solvente, para obtener una concentración de 500 µg/mL.

3.2.1.3 Solución metanólica de clomipramina (estándar interno)

En un matraz volumétrico de 50 mL, se colocaron 5 mg de clomipramina disolviendo en metanol y llevando al aforo con el mismo solvente. La concentración de clomipramina fué de 100 µg/mL.

3.2.1.4 Solución enzimática de β-glucoronidasa de 8000 U/mL.

De una solución de enzima β-glucoronidasa de 97,200 U/mL se tomaron 823 µL de enzima, disolviendo y aforando a 10 mL con solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2M a pH de 5.0,. La solución de acetato de sodio se preparó colocando 1.3608 g de acetato de sodio en un matraz, se disolvió y aforó a 50 mL con agua, posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con ácido o-fosfórico al 8.5%.

3.2.2 Fase móvil

La fase móvil que se utilizó fue acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfato 0.01M (35:65). Para ello se preparó una solución de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 0.01M, colocando en un matraz 1.3609 g de KH₂PO₄, se disolvió y aforó a 1000 mL con agua y se ajustó a pH de 4 con ácido o-fosfórico al 8.5%. Tanto el acetonitrilo como el buffer de fosfatos fueron desgasificados con helio.





3.2.3 Preparación de la curva patrón en orina

En la **Tabla 3.1** se presentan las concentraciones empleadas en la curva patrón. Para su análisis se empleó el procedimiento **3.2.4** y se inyectó al sistema cromatográfico bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La respuesta se midió determinando el área de dextrometorfán ó dextrorfán entre el área del estándar interno (E.I).

Tabla 3.1 Preparación de la curva patrón conteniendo dextrometorfán y dextrorfán en orina.

Conc. de DM $\mu\text{g/mL}$	Alic. de Stock DM (μL)	Conc. de DT $\mu\text{g/mL}$	Alic. de Stock DM (μL)	Aforo mL
0.1	10	1	20	10
0.5	50	5	100	10
1	100	10	200	10
2	200	30	600	10
4	400	60	1200	10
6	600	70	1400	10

3.2.4 Procedimiento para cuantificar dextrorfán total y dextrometorfán en orina

En un tubo de ensaye de 15 mL con tapón de rosca, se colocaron 2 mL de la muestra de orina, se adicionaron 500 μL de enzima β -glucorinadasa y se incubó durante 18 hrs. en baño María a 37 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 50 μL de la solución de estándar interno (clomipramina, 100 $\mu\text{g/mL}$), 500 μL de una solución saturada de carbonato de sodio y 10 mL de diclorometano. Se agitó durante 10 minutos en agitador horizontal a 300 rpm. y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm, durante 15 min. Se separó la fase orgánica (capa inferior) con pipeta pasteur, se transfirió a un tubo de de 10 mL y se evaporó bajo corriente de nitrógeno a 40 $^{\circ}\text{C}$ y el residuo se reconstituyó con 200 μL de fase móvil, se agitó durante 10 seg. en vortex y se inyectaron 100 μL al sistema cromatográfico.





3.2.5 Procedimiento para cuantificar dextrorfán libre y dextrometorfán en orina

En un tubo de ensaye de 15 mL con tapón de rosca, se colocaron 2 mL de la muestra de orina, se agregaron 50 μ L de la solución de estándar interno (clomipramina, 100 μ g/mL), 500 μ L de una solución saturada de carbonato de sodio y 10 mL de diclorometano. Se agitó durante 10 minutos en agitador horizontal a 300 rpm. y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm., durante 15 min. Se separó la fase orgánica (capa inferior) con pipeta pasteur, se de nitrógeno a 40 °C.

La secuencia del método empleado se presenta en la **Fig. 3.1**

3.2.6 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Columna spherisorb de fenilo de Waters, 4.6 x 250 mm

Presión aproximada de 260 bar.

Temperatura ambiente

Tiempo de corrida 23 min.

Longitud de onda 280 nm.

Flujo de 1.3 mL/min.

Fase móvil acetonitrilo:buffer de fosfato monobásico de potasio 0.01M a pH de 4 35:65.



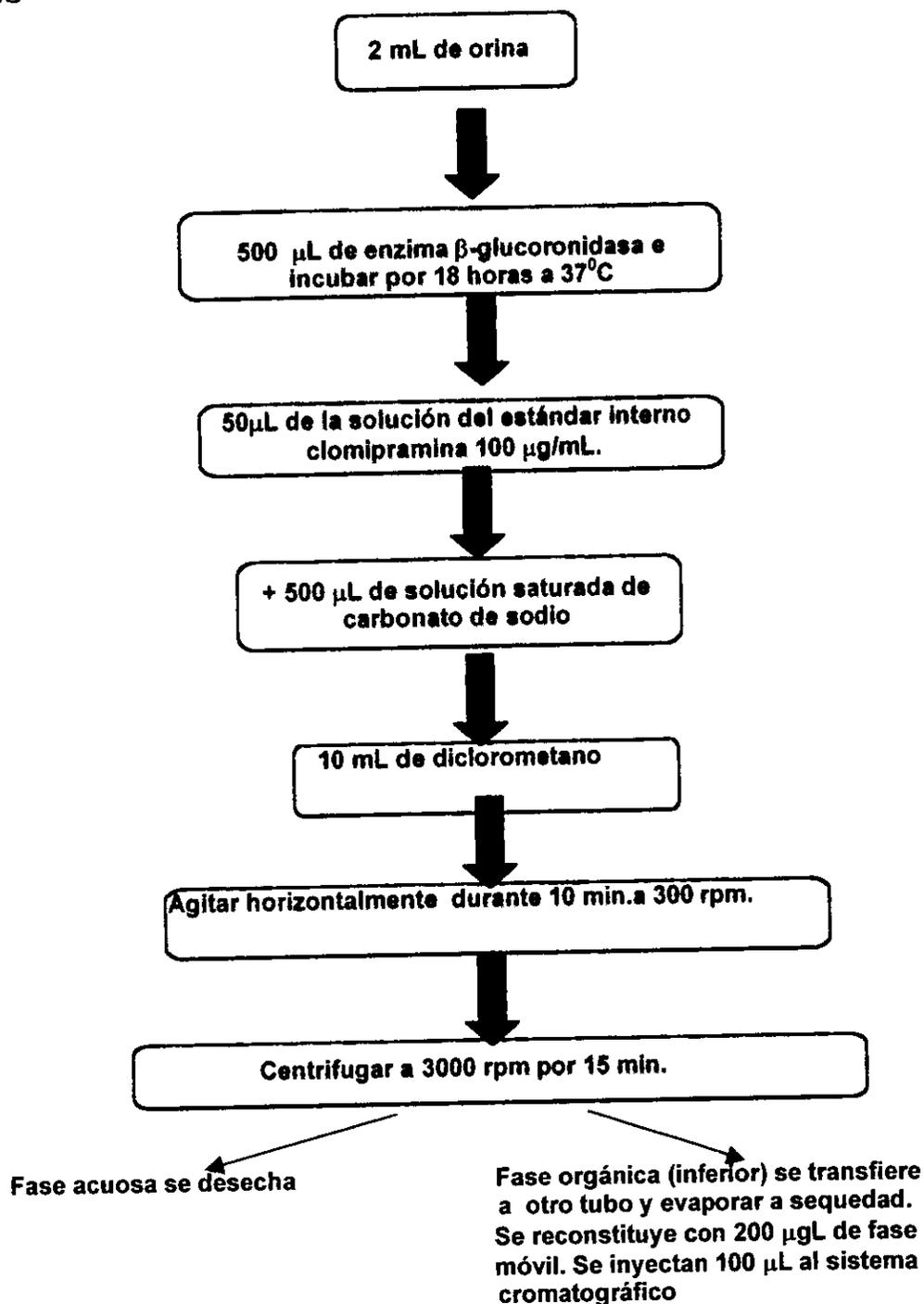


Fig. 3.1. Diagrama del método de extracción para la cuantificación de dextrorfan total y dexmetorfan en orina.





3.3 Validación del método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en orina.

3.3.1. Linealidad del sistema

A fin de determinar la linealidad del sistema se prepararon 3 curvas patrón de dextrometorfán (DM) y dextrorfán (DT) en metanol en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 6 $\mu\text{g/mL}$ y de 1 a 70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se graficó la relación de áreas entre estándar interno EI (DM/E.I y DT/E.I), con respecto a la concentración de DM y DT, y se calculó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

3.3.2 Linealidad del método

La linealidad del método se determinó preparando tres curvas patrón independientes en orina siguiendo los lineamientos indicados en 3.2.5. Se graficó la relación de áreas (DM/E.I y DT/E.I) contra la concentración del fármaco en un intervalo de concentraciones de 0.1 a 6 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán y de 1 a 70 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

3.3.3 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad se evaluó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón en orina y se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de los resultados obtenidos. La reproducibilidad se evaluó preparando tres curvas patrón en orina, tres días diferentes y se determinó el coeficiente de variación.





3.3.4 Especificidad

La especificidad del método se determinó evaluando la no interferencia del ácido salicílico, el cual es un fármaco consumido comúnmente. Así mismo, se probó la no interferencia de tolueno empleado en la conservación de la muestra.

Para llevar a cabo la prueba se trabajó por duplicado el punto 3 de la curva patrón en orina conteniendo los estándares de clomipramina, dextrometorfán, dextrorfán, y se les adicionó tolueno y ácido salicílico.

3.3.5 Exactitud

La exactitud se calculó como el porcentaje de desviación del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad.

$$\% \text{ de desviación} = \frac{|\text{Valor nominal} - \text{valor verdadero}|}{\text{valor nominal}} * 100$$

3.3.6 Límite de detección y cuantificación.

El límite de detección se calculó haciendo diluciones del último punto de la curva hasta que la señal detectable fuera 3 veces la señal del ruido.

El límite de cuantificación se estableció como la más baja concentración de fármaco que puede ser cuantificado con exactitud y precisión bajo las condiciones normales de operación.

3.3.7 Recobro

El porcentaje de recobro, se determinó preparando 3 curvas patrón en orina y tres curvas patrón en metanol, adicionadas con dextrometorfán y dextrorfán a los niveles de concentración establecidos y se comparó la respuesta obtenida en el sistema y la respuesta obtenida en orina después del método de extracción indicado en el apartado 3.2.5.





3.3.8 Estabilidad

La estabilidad del dextrometorfán y del dextrorfán en orina se verificó en dos modalidades:

3.3.8.1 Estabilidad con 4 ciclos de congelación/descongelación.

Se prepararon los puntos 2 , 3 y 5 de la curva patrón en orina correspondientes a las concentraciones de 0.5, 1 y 4 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán y 5, 10 y 60 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán, repartiéndose individualmente las disoluciones en tubos de ensayo con una capacidad de 15 mL . Se efectuó el análisis inicial de acuerdo al procedimiento 3.2.5 y las disoluciones restantes se mantuvieron en congelación a una temperatura de -5°C . Se analizaron por duplicado a las 24 y 48 horas y a los 15 y 30 días siguiendo el mismo procedimiento.

3.3.8.2 Estabilidad en el residuo evaporado.

Se prepararon los puntos 2 , 3 y 5 de la curva patrón en orina correspondientes a las concentraciones de 0.5, 1 y 4 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán y 5, 10 y 60 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán. Se transfirieron individualmente 2 mL a tubos de ensayo con capacidad de 15 mL. Se analizaron inicialmente por duplicado de acuerdo a 3.2.5 y las muestras restantes se procesaron hasta el último paso de evaporación de la fase orgánica. Estas muestras se guardaron en refrigeración. Se analizaron por duplicado a las 24 y 48 horas de haber sido almacenadas. Las muestras se resuspendieron en fase móvil al momento de su análisis.

3.4 Estudio del fenotipo metabolizador en voluntarios sanos.

3.4.1 Producto comercial utilizado en el estudio

ROMILAR jarabe, presentación frasco de 100 mL de laboratorios ROCHE. México, conteniendo 0.3 g de bromhidrato de dextrometorfán.





3.4.2 Voluntarios

En el estudio participaron 43 voluntarios 27 del sexo femenino y 16 del sexo masculino con edades comprendidas entre 16 y 52 años. Los sujetos se encontraron en buen estado de salud.

A los participantes se les informó de la naturaleza y fines del estudio mediante un formato que contuvo las indicaciones a seguir durante el mismo, así como las características del fármaco y los posibles efectos secundarios. Los voluntarios firmaron una hoja de consentimiento en la cual expresaron por voluntad propia su participación en el estudio y se les aplicó un pequeño cuestionario para saber algunos datos generales. En el APENDICE I se muestra la hoja de consentimiento de los voluntarios y en el APENDICE II se anexa la hoja control de los voluntarios así como el cuestionario que se les aplicó.

4.4.2.1 Criterios de exclusión.

Los voluntarios no se admitieron ó fueron excluidos del estudio si:

Tomaron algún medicamento 3 días previos al estudio.

Tomaron algún medicamento durante el estudio.

Tenían alguna enfermedad hepática, renal ó asociada a problemas del desarrollo.

3.4.3 Protocolo de estudio

Los voluntarios se ajustaron al siguiente protocolo.

Antes de la administración del fármaco los voluntarios vaciaron completamente la vejiga.

A las 10:00 PM del día del estudio ingirieron 20 mL de jarabe ROMILAR de ROCHE, equivalentes a 60 mg de dextrometorfán, con un vaso con agua. El volumen de jarabe se midió con el vaso dosificador proporcionado en el producto farmacéutico.

Se colectó la orina durante las 8 horas posteriores a la administración del jarabe, en frascos de vidrio color ámbar.





El volumen total de orina se midió y se tomó una alícuota de 40 mL la cual se centrifugó y posteriormente se le adicionó tolueno para su conservación. La muestra se congeló -5°C hasta el momento de su análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

3.4.4 Consideraciones éticas

Los sujetos voluntarios que participaron en el estudio fueron tratados de acuerdo a los protocolos de la declaración de Helsinki y las regulaciones locales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y de nuestro país con el objeto de salvaguardar sus derechos y bienestar.

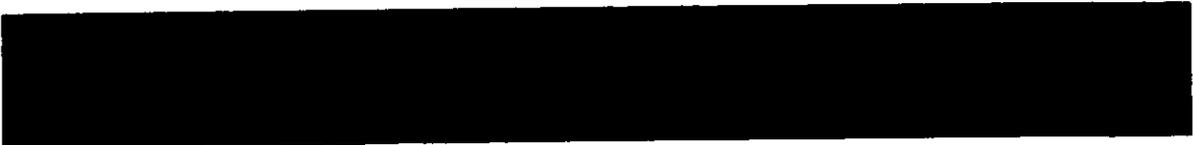
3.4.5 Análisis de los resultados.

Para determinar el fenotipo metabolizador se calculó la relación entre dextrometorfán/dextrorfán total. La clasificación se llevó a cabo de la siguiente manera: si la relación era mayor a 0.3, el sujeto se clasificó como metabolizador pobre y una proporción metabólica menor que 0.3 correspondía a un metabolizador rápido.





IV. Resultados





Resultados

4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de dextrometorfan y dextrorfan en orina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Los criterios para la validación del método analítico se basaron en las recomendaciones y lineamientos especificados por diferentes organismos internacionales.^{64,65} A continuación se presentan los resultados obtenidos.

4.1.1 Linealidad del sistema

En las Tabla 4.1 y 4.2 se muestran los resultados obtenidos a partir de 3 curvas de calibración en metanol conteniendo dextrometorfán, dextrorfán y clomipramina como estándar interno, y en las Fig. 4.1 y 4.2 se muestran las gráficas correspondientes para DM y DT respectivamente.

Tabla 4.1. Linealidad del sistema para la cuantificación de DM en metanol

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RELACION DE AREAS/E.I			
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO
0.1	0.0109	0.0109	0.0109	0.0109
0.5	0.0573	0.0578	0.0562	0.0571
1	0.1351	0.1309	0.1356	0.1339
2	0.2730	0.2698	0.2703	0.2710
4	0.5519	0.5475	0.5487	0.5494
6	0.7986	0.7936	0.7895	0.7939

$$A = -0.0016$$

$$B = 0.1342$$

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9992$$

Tabla 4.2. Linealidad del sistema para la cuantificación de DT en metanol

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RELACION DE AREAS/E.I			
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO
1	0.1469	0.1458	0.1366	0.1431
5	0.7978	0.7988	0.7947	0.7971
10	1.4542	1.4512	1.4524	1.4526
30	3.9823	3.9900	3.9805	3.9843
60	7.9985	7.9875	7.9799	7.9886
70	9.5321	9.5402	9.5391	9.5371

$$A = -0.0507$$

$$B = 0.1368$$

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9992$$





Resultados

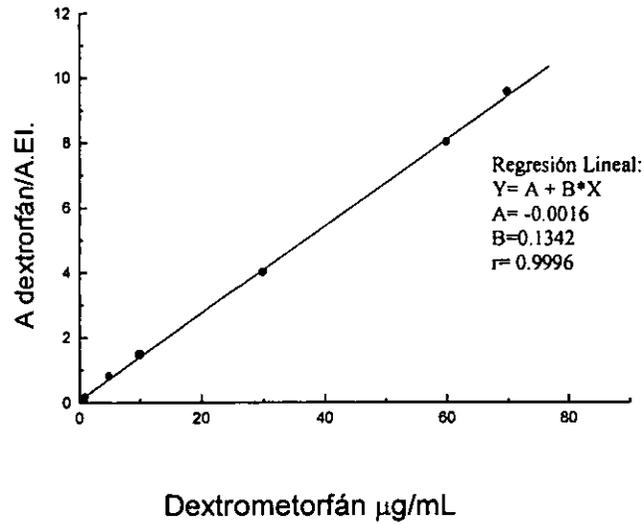


Fig. 4.1 Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrometorfán en metanol.

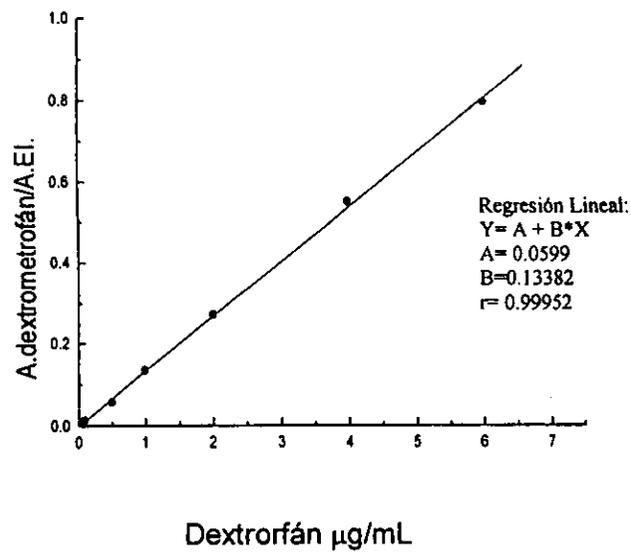


Fig. 4.2 Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrofrán en metanol.





4.1.2 Linealidad del método

En la Fig. 4.3 se muestra la linealidad del método analítico para cuantificar dextrometorfán en el intervalo de concentración es de 0.1 a 6 $\mu\text{g/mL}$. La ecuación de la recta promedio fue: $y = 0.1329 + 0.0055x$, con un coeficiente de correlación de 0.9989.

En la Fig. 4.4 se muestra la linealidad del método analítico para la cuantificación de dextrorfán en el intervalo de concentración de 1 a 70 $\mu\text{g/mL}$. La ecuación de la recta promedio fue: $y = 0.1273 + 0.0941x$, con un coeficiente de correlación de 0.9997.

Para evaluar la linealidad del método se calculó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (B) y la ordenada al origen (A) de la curva de regresión, estos datos se presentan en la Tablas 4.3 y 4.4.

Tabla 4.3. Linealidad del método para la cuantificación de DM en orina.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RELACION DE AREAS/E.I			
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO
0.1	0.0096	0.0099	0.0097	0.0097
0.5	0.0568	0.0541	0.0550	0.0553
1	0.1115	0.1140	0.1298	0.1184
2	0.2696	0.2465	0.2565	0.2575
4	0.5475	0.5498	0.5551	0.5508
6	0.7790	0.7790	0.7788	0.7789

$$A = - 0.0054$$

$$B = 0.1329$$

$$r = 0.9989$$

$$r^2 = 0.9978$$

Tabla 4.4. Linealidad del método para la cuantificación de DT en orina.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RELACION DE AREAS/E.I			
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO
1	0.1431	0.1408	0.1481	0.1440
5	0.7193	0.7283	0.7300	0.7259
10	1.4246	1.4349	1.4896	1.4497
30	3.4362	3.8081	3.7054	3.6499
60	7.6917	7.2804	7.4891	7.4871
70	9.1268	8.8800	8.6442	8.8837

$$A = - 0.0941$$

$$B = 0.1273$$

$$r = 0.9997$$

$$r^2 = 0.9995$$





Resultados

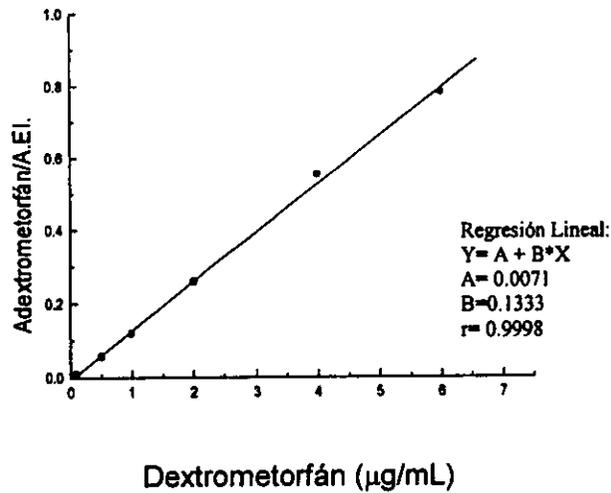


Fig. 4.3 Linealidad del método para cuantificar dextrometorfán en orina

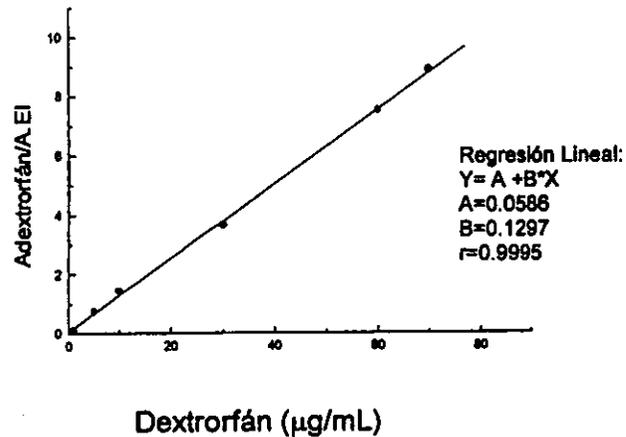


Fig. 4.4 Linealidad del método para cuantificar dextrorfán en orina





4.1.3 Repetibilidad y reproducibilidad.

En las Tablas 4.5 y 4.6 se presentan los resultados de repetibilidad al analizar tres réplicas de cada concentración en el mismo día tanto para dextrometorfán como para dextroorfán. Así como, las Tablas 4.7 y 4.8 resumen los resultados obtenidos al analizar las curvas de calibración analizadas en tres días diferentes con tres replicas cada concentración. Se puede observar que todos los coeficientes de variación fueron menores al 10%.

Tabla 4.5 Repetibilidad de dextrometorfán

Conc.(ug/ml.)	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.promedio	DS.	C.V.
0.1	0.0096	0.0099	0.0097	0.0097	0.0002	1.57
0.5	0.0568	0.0541	0.0550	0.0553	0.0014	2.49
1	0.1115	0.1140	0.1298	0.1184	0.0099	8.38
2	0.2696	0.2465	0.2565	0.2575	0.0116	4.50
4	0.5475	0.5498	0.5551	0.5508	0.0039	0.71
6	0.7790	0.7790	0.7788	0.7789	0.0001	0.01

Tabla 4.6 Repetibilidad de dextroorfán

Conc.(ug/mL)	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.promedio	DS.	C.V.
1	0.1431	0.1408	0.1481	0.1440	0.0037	2.59
5	0.7193	0.7283	0.7300	0.7259	0.0058	0.79
10	1.4246	1.4349	1.4896	1.4497	0.0349	2.41
30	3.4362	3.8081	3.7054	3.6499	0.1921	5.26
60	7.6917	7.2804	7.4891	7.4871	0.2057	2.75
70	9.1268	8.8800	8.6442	8.8837	0.2413	2.72





Tabla 4.7 Reproducibilidad del dextrometorfán

Conc (ug/mL)	DIA 1			DIA 2			DIA 3			C.V.
	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	
0.1	0.0096	0.0099	0.0097	0.0098	0.0096	0.0097	0.0099	0.0097	0.0096	1.23
0.5	0.0568	0.0541	0.0550	0.0546	0.0548	0.0544	0.0547	0.0548	0.0558	1.49
1	0.1115	0.1140	0.1298	0.1187	0.1284	0.1284	0.1186	0.1192	0.1231	5.23
2	0.2696	0.2465	0.2565	0.2618	0.2579	0.2579	0.2617	0.2702	0.2599	2.76
4	0.5475	0.5498	0.5551	0.5573	0.5412	0.5412	0.5579	0.5498	0.5474	1.12
6	0.7790	0.7790	0.7788	0.7766	0.7802	0.7802	0.7758	0.7800	0.7791	0.53

Tabla 4.8 Reproducibilidad del dextrotrófán

Conc (ug/mL)	DIA 1			DIA 2			DIA 3			C.V.
	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	Rel.áreas 1	Rel.áreas 2	Rel.áreas 3	
1	0.1431	0.1408	0.1481	0.1456	0.1438	0.1429	0.1449	0.1452	0.1461	1.47
5	0.7193	0.7283	0.7300	0.7298	0.7351	0.7245	0.7295	0.7311	0.7321	0.63
10	1.4246	1.4349	1.4896	1.4563	1.4603	1.4648	1.4637	1.4685	1.4704	1.32
30	3.4362	3.8081	3.7054	3.4821	3.5601	3.5774	3.4827	3.4798	3.4779	3.49
60	7.6917	7.2804	7.4891	7.6675	7.5478	7.6213	7.6586	7.6677	7.6453	1.74
70	9.1268	8.8800	8.6442	9.1258	9.0989	9.1330	9.1443	9.1522	9.1511	1.93





4.1.4 Especificidad

En la Fig. 4.5 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a: a) blanco de orina, b) en metanol, c) orina de voluntario sin hidrólisis enzimática y d) orina de voluntario después de la hidrólisis enzimática, adicionados con clomipramina como estándar interno. Los tiempos de retención fueron: para DT 9.31, DM de 21.32 y CMI de 31.15 minutos.

También se puede observar que no hubo interferencia por parte del ácido salicílico y el tolueno.

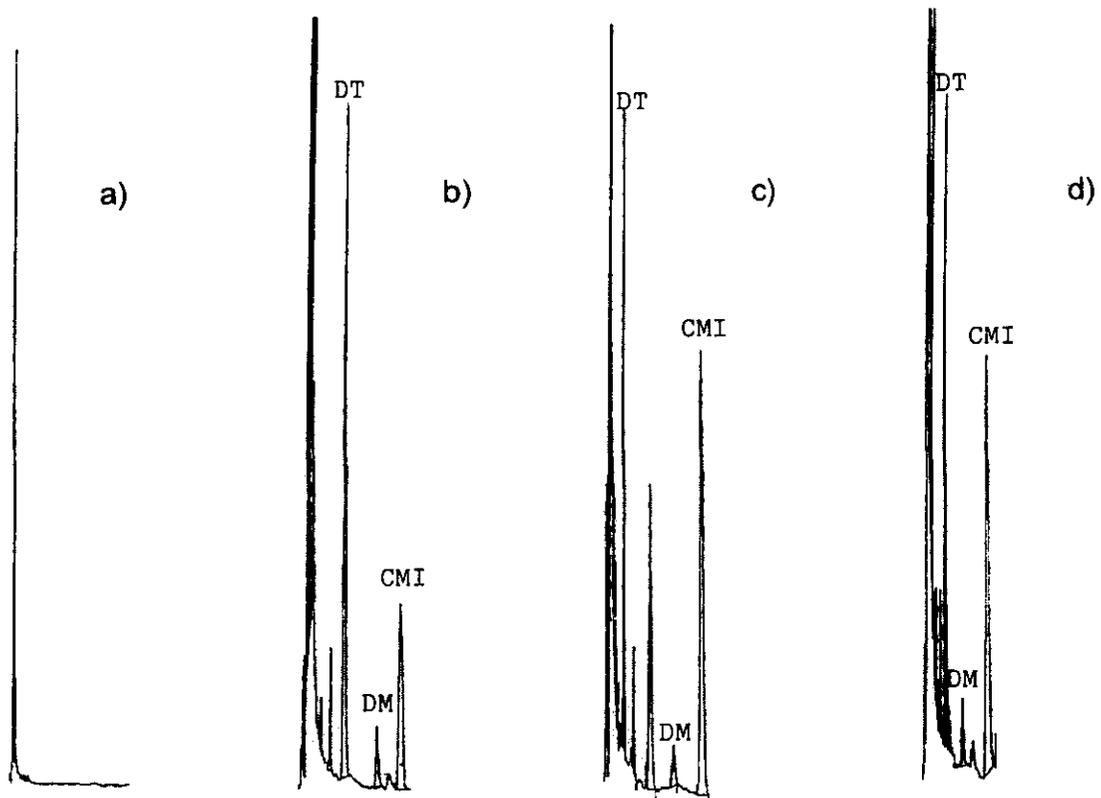


Fig. 4.5- a) Blanco de orina, b) Cromatograma en metanol, c) Muestra de voluntario sin hidrólisis enzimática, d) Muestra de orina después de la hidrólisis enzimática





4.1.5 Exactitud

En las **Tabla 4.5** se muestran los datos de exactitud obtenidos tanto para dextrometorfán como para dextrorfán en donde se observan que el por ciento de desviación para cada nivel de concentración no es mayor del 15%.

Tabla 4.9 Exactitud del método analítico

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DM	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DT
	% Desviación		% Desviación
0.1	12.9	1	14.8
0.5	9.1	5	9.2
1	4.8	10	12.2
2	0.2	30	7.4
4	4.8	60	0.7
6	1.8	70	1.6

4.1.6 Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos se reportan en la **Tabla 4.10**. El coeficiente de variación de las muestras adicionadas con la concentración mínima cuantificable 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de dextrometorfán y 0.05 $\mu\text{g/mL}$ de dextrorfán fue de 4.94 y 12.52% respectivamente. Así mismo, el límite de detección fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán y de 0.025 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán.

Tabla 4.10 Límite de detección y de cuantificación para dextrometorfán y dextrorfán

	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)
DM	0.1	0.05
DT	0.05	0.025





4.1.7 Recobro

El porcentaje de recobro se evaluó determinando la cantidad de fármaco recuperado después del proceso de extracción en orina comparándolo con la respuesta obtenida en metanol, sin haber realizado el proceso de extracción. En la **Tabla 4.11** se muestran los resultados del porcentaje de recobro en muestras urinarias adicionadas con dextrometorfán y dextrotrófán, se observa que dicho porcentaje estuvo en un rango de 88.83 a 100.44% para dextrometorfán y de 91.06 a 100.63% para dextrotrófán.

Tabla 4.11 Porcentaje de recobro en muestras urinarias adicionadas con dextrometorfán y dextrotrófán.

Concentración µg/mL	DM	Concentración µg/mL	DT
	%Recobro		%Recobro
0.1	88.83	1	100.63
0.5	96.32	5	91.06
1	90.45	10	99.80
2	96.30	30	91.61
4	100.44	60	93.72
6	97.70	70	93.15
	Media 95.04		Media 94.99

4.1.8 Estabilidad

En las **Tablas 4.12** y **4.13** se presentan los datos de estabilidad de las muestras urinarias mantenidas en congelación y en la **Tablas 4.14** y **4.15** se encuentran los resultados de estabilidad del residuo evaporado.





Resultados

Tabla 4.12 Estabilidad de dextrometorfán en orina con 4 ciclos de congelación/descongelación.

Tiempo de análisis	Relación de áreas/E.I		
	Concentración		
	0.5 ($\mu\text{g/mL}$)	1 ($\mu\text{g/mL}$)	4 ($\mu\text{g/mL}$)
Tiempo 0	0.4364	0.9749	4.2050
24 Horas	0.4388	0.9660	4.2072
	0.4349	0.9593	4.1786
48 Horas	0.4453	0.9534	4.2599
	0.4347	0.9803	4.1319
2 Semanas	0.4400	0.9780	4.8775
	0.4297	0.8801	5.0126
4 semanas	0.4384	0.8786	4.0890
	0.4496	1.0885	4.1379
	0.4228	1.0836	4.1488
Promedio	0.44	0.97	4.32
D.S.	0.01	0.07	0.33
C.V.	1.72	7.16	7.67

Tabla 4.13 Estabilidad de dextrofrán en orina con 4 ciclos de congelación/descongelación..

Tiempo de análisis	Relación de áreas/E.I		
	Concentración		
	5 ($\mu\text{g/mL}$)	10 ($\mu\text{g/mL}$)	60 ($\mu\text{g/mL}$)
Tiempo 0	4.2996	10.6896	59.6342
24 Horas	4.2911	10.7364	59.6434
	4.0393	10.3720	59.9800
48 Horas	4.1237	10.4034	59.1617
	4.1840	10.5819	59.4188
2 Semanas	4.1886	10.5896	59.6405
	3.8679	10.2783	59.6178
4 semanas	3.8522	10.2689	59.4398
	3.8396	9.47778	58.5185
	3.9367	9.46040	56.4482
Promedio	4.06	10.29	59.15
D.S.	0.18	0.46	1.03
C.V.	4.43	4.47	1.74





Tabla 4.14 Estabilidad de dextrometorfán en muestras procesadas.

Conc. $\mu\text{g/mL}$	0.5	1	4
Tiempo 0	0.4321	0.9772	4.2013
	0.4410	0.9510	4.2110
24 Horas	0.4326	0.9660	4.2203
	0.4155	0.9750	4.1293
48 Horas	0.4435	0.9938	4.1905
	0.4505	0.9269	4.8775
Promedio	0.44	0.96	4.30
D.S.	0.01	0.02	0.28
C.V.	2.79	2.42	6.56

Tabla 4.15 Estabilidad de dextrorfán en muestras procesadas.

Conc. $\mu\text{g/mL}$	5	10	60
Tiempo 0	4.2934	10.6511	59.6373
	4.3088	10.5274	59.6250
24 Horas	4.0501	10.3728	59.0697
	4.1015	10.3927	58.6265
48 Horas	4.1863	10.5850	59.3537
	4.181	10.5850	59.4219
Promedio	4.19	10.52	59.29
D.S.	0.10	0.11	0.39
C.V.	2.44	1.07	0.65

Por los resultados de validación se puede establecer que el método cumple con los criterios para ser utilizado en el estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6.

4.2 Estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6

En este estudio participaron 43 voluntarios sanos, 16 hombres y 27 mujeres, con edades entre 15 a 52 años, estaturas de 1.54 a 1.90 mts, y un peso de 46-96 Kgs, de estos voluntarios 6 eran fumadores, los datos se muestran en el apéndice APENDICE III.





Resultados

En la **Tabla 4.16** se muestran los resultados del fenotipo metabolizador de los 43 voluntarios; En dicha tabla se señala el volumen de orina colectado, la concentración de dextrometorfán, concentración de dextrorfán libre, y dextrorfán total, así como, la concentración de dextrorfán conjugado la cual se determinó por diferencia entre el dextrorfán total (determinado después de la hidrólisis enzimática) y el dextrorfán libre. También se pueden observar el porcentaje recuperado de dextrometorfán y dextrorfán total.

En la **Tabla 4.17** se observan las proporciones metabólicas de cada uno de los voluntarios. Una proporción metabólica > 0.3 representa a un metabolizador pobre (PM) y una proporción metabólica < 0.3 representa a un metabolizador rápido.





Resultados

Tabla 4.16 Resultados del fenotipo metabolizador en voluntarios sanos

VOLUNTARIO	Vol. de orina (mL)	CONC. ug/mL DM	CONC. ug/mL DT Libre	CONC. ug/mL DT total	CONC. ug/mL DT conjugado	CANT. µg DM	CANT. µg DT total	% REC. DM	% REC. DT total
1	395	1.3289	11.5828	84.4811	72.8985	524.92	333370.03	0.87	55.62
2	295	1.2425	8.9789	107.9140	98.9371	366.54	31834.63	0.61	53.08
3	400	0.2128	4.6749	54.8394	50.1645	85.12	21935.76	0.14	36.58
4	100	3.4072	3.1913	14.8549	11.6636	340.72	1485.49	0.57	2.48
5	445	0.6386	5.5036	66.6270	61.1234	284.18	29849.02	0.47	49.42
6	150	0.1585	9.9332	100.4944	90.5612	23.78	15074.16	0.04	25.12
7	225	0.1366	7.9135	130.3877	122.4742	30.74	29337.23	0.05	48.90
8	425	0.2741	14.5154	62.2796	47.7642	116.49	26468.83	0.19	44.11
9	530	0.7750	5.8586	47.8775	42.0189	410.75	25375.08	0.68	42.29
10	530	0.2174	1.6667	48.8100	47.1433	115.22	25869.30	0.19	43.12
11	600	0.4213	1.4043	5.8135	4.2092	252.78	3368.10	0.42	5.61
12	910	0.3251	1.7414	8.8553	7.1139	295.78	8058.32	0.49	13.43
13	208	0.6471	6.4563	69.5810	63.1247	134.60	14472.84	0.22	24.12
14	122	0.5431	7.4184	85.1900	77.7716	66.26	10393.18	0.11	17.32
15	690	0.6180	2.7383	48.7830	46.0447	426.42	33860.27	0.71	58.10
16	610	1.07724	5.1182	25.7263	20.8081	657.12	15693.04	1.10	26.16
17	645	0.1997	0.9764	3.5416	2.5652	128.81	2284.33	0.21	3.81
18	160	0.2952	9.1497	52.4069	43.2572	47.23	8385.10	0.08	13.98
19	690	0.3339	0.0696	2.4854	2.4158	230.39	1714.93	0.38	2.86
20	740	0.6104	3.7071	60.2651	56.5580	451.70	44596.17	0.75	74.33
21	325	0.4609	3.4750	68.8809	65.3859	149.79	22379.79	0.25	37.30
22	610	0.5001	4.0018	34.9951	30.9933	305.06	21347.01	0.51	35.58
23	460	0.9135	5.5309	58.3368	52.8059	420.21	26834.93	0.70	44.72
24	440	0.1156	1.7596	26.336	24.5764	50.86	11587.84	0.08	19.31
25	180	0.1162	3.9208	57.598	53.6772	20.92	10367.64	0.03	17.28
26	190	0.6295	13.7034	63.0341	49.3307	119.61	11976.48	0.20	19.96
27	310	0.7218	1.5615	50.0725	48.5110	223.76	15522.48	0.37	25.87
28	500	0.2285	0.3024	9.9675	9.6651	114.25	4983.75	0.19	8.31
29	605	0.4421	1.1396	8.095	6.9554	267.47	4897.48	0.45	8.16
30	360	1.0148	8.0422	98.9420	90.8998	365.33	35619.12	0.61	59.37
31	510	1.0330	3.0059	58.3393	55.3334	526.83	29753.04	0.88	49.59
32	205	0.3392	1.2386	7.46	6.2214	69.54	1529.30	0.12	2.55
33	250	0.2502	0.1949	1.1099	0.9150	52.55	277.48	0.10	0.46
34	290	0.246	3.3523	27.5679	24.2156	71.34	7994.69	0.12	13.32
35	1060	0.6768	0.1151	3.4837	3.3686	717.41	3692.72	1.20	6.15
36	420	0.3347	1.2699	15.4321	14.1622	140.57	6481.48	0.23	10.80
37	655	0.4579	1.3971	2.9022	1.5051	299.92	1900.94	0.50	3.17
38	350	4.2423	0.1494	0.2776	0.1282	1484.61	87.16	2.47	0.16
39	335	0.6136	2.5784	16.8287	14.2503	205.56	5637.61	0.34	9.40
40	225	0.4826	3.1727	22.213	19.0403	108.59	4997.93	0.18	8.33
41	435	0.2256	1.9368	23.7847	21.8479	96.14	10346.34	0.16	17.24
42	550	0.4266	0.7755	9.7043	8.9288	234.63	53337.37	0.39	8.90
43	355	0.1220	2.5281	18.6403	16.1122	43.31	6617.31	0.07	11.03





Resultados

Tabla 4.17 Resultados del estudio para determinar el fenotipo metabolizador.

VOLUNTARIO	Prop. Metab.	Fenotipo	Prop. Metab.	Fenotipo
	DM/DT total		DM/DT libre	
1	0.0157	EM	0.1147	EM
2	0.0115	EM	0.1384	EM
3	0.0039	EM	0.0455	EM
4	0.2284	EM	1.0677	PM
5	0.0086	EM	0.1180	EM
6	0.0016	EM	0.0180	EM
7	0.0010	EM	0.0173	EM
8	0.0044	EM	0.0189	EM
9	0.0162	EM	0.1323	EM
10	0.0045	EM	0.1304	EM
11	0.0751	EM	0.3000	PM
12	0.0387	EM	0.1887	EM
13	0.0084	EM	0.0732	EM
14	0.0084	EM	0.0732	EM
15	0.0127	EM	0.2257	EM
16	0.0418	EM	0.2105	EM
17	0.0584	EM	0.2045	EM
18	0.0056	EM	0.0323	EM
19	0.1343	EM	4.7974	PM
20	0.0101	EM	0.1647	EM
21	0.0087	EM	0.1328	EM
22	0.0143	EM	0.1250	EM
23	0.0157	EM	0.1852	EM
24	0.0044	EM	0.0657	EM
25	0.0020	EM	0.0286	EM
26	0.0100	EM	0.0459	EM
27	0.0144	EM	0.4822	PM
28	0.0229	EM	0.7556	PM
29	0.0546	EM	0.3879	PM
30	0.0103	EM	0.1282	EM
31	0.0177	EM	0.3437	PM
32	0.0455	EM	0.2739	EM
33	0.2254	EM	1.2837	PM
34	0.0089	EM	0.0734	EM
35	0.1943	EM	5.8801	PM
36	0.0217	EM	0.2836	EM
37	0.1578	EM	0.3278	PM
38	15.2821	PM	28.3956	PM
39	0.0365	EM	0.2380	EM
40	0.0217	EM	0.1521	EM
41	0.0095	EM	0.1185	EM
42	0.0440	EM	0.5501	PM
43	0.0085	EM	0.0483	EM





V. Discusión





5.1 Validación del método analítico para cuantificar DM y DT en orina por CLAR.

Debido a que el objetivo de este trabajo era determinar el fenotipo metabolizador, era necesario contar con un método analítico confiable para cuantificar al dextrometorfán y dextrorfán en orina, por lo que se reprodujo un método analítico previamente publicado con algunas modificaciones de otro.⁵⁴

De los resultados obtenidos en la validación del método analítico se encontró:

5.1.1 Linealidad del método

Al graficar la relación de áreas/estándar interno, respecto a la concentración se encontró que el método se comportó de una manera lineal en el intervalo de concentración de 0.1 a 6 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán (Fig.4.3) y de 1 a 70 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán (Fig. 4.4). Se seleccionó este rango de concentraciones con base en publicaciones previas de otros países.

5.1.2 Repetibilidad y reproducibilidad

Los resultados muestran que el C.V. máximo encontrado en el mismo día de análisis fue de 8.38% para dextrometorfán y de 5.26% para dextrorfán. Así mismo, se puede ver que el C.V. máximo interdía es de 5.23% para dextrometorfán y de 3.49% para dextrorfán. Considerando que el límite de variación permitido para establecer como preciso un método analítico aplicado a fluidos biológicos es del 15% y que en el límite de cuantificación se aplica el 20%^{64,65}, se encontró que el método analítico fue preciso.

5.1.3 Especificidad

En la Fig. 4.5 se puede observar que los componentes de la matriz biológica no interfirieron en las respuestas cromatográficas de dextrometorfán y dextrorfán. Así mismo ni el tolueno ni la hidrólisis interfirieron en el análisis.





5.1.4 Exactitud

En la **Tabla 4.9** se puede observar que el por ciento de desviación máximo para adexetrometorfán fue del 12.9% y para dexetrometorfán fue del 14.8% por lo que el método se considera exacto ya que el límite máximo permitido es del 15%.⁶⁵

5.1.4 Límite de detección y cuantificación

Con base a que el coeficiente de variación de las muestras adicionadas con la concentración mínima cuantificable de DM y DT fue de 4.94 y 12.52% respectivamente y con fundamento en que el C.V. aceptado para el límite de cuantificación es del 20%^{65,66}, se determinó que el límite de cuantificación del 0.1 µg/mL para DM y de 0.05 µg/mL para DT cumplía con las especificaciones. Por otra parte, considerando que el criterio para la determinación del LOD es obtener una señal 3 veces el ruido de fondo, se encontró que el límite de detección para DM fue de 0.05 µg/mL y para DT fue de 0.025 µg/mL. Por lo que en base a las concentraciones urinarias esperadas el método pudo ser utilizado.

5.1.5 Porcentaje de recobro

De acuerdo a la **Tabla 4.11** los resultados promedios del por ciento de recobro fueron del 95.04% para dexetrometorfán y 94.99% para dexetrometorfán, lo cual fue adecuado para las necesidades analíticas establecidas. Por lo que, el método se consideró exacto.

5.1.6 Estabilidad

En las **Tablas 4.12 y 4.13** se observa una variación de las muestras urinarias con 4 ciclos de congelación/descongelación fue del 10% por lo que se concluye que las muestras son estables hasta un mes a -20 °C. En el caso de las muestras evaporadas se puede observar en las **Tablas 4.14 y 4.15** que se mantienen estables hasta 48 horas una vez que han sido extraídas de la matriz y se conservan en refrigeración.

5.2 Estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6.

El CYP2D6 es la isoenzima del citocromo P450 más estudiada, ya que por esta vía se biotransforman una serie de fármacos clínicamente importantes, tales como antiarítmicos, antidiépresivos y β-bloqueadores, entre otros.





La relevancia clínica del polimorfismo de CYP2D6 radica en que los metabolizadores pobres que presentan un potencial bajo para biotransformar a los fármacos sustratos de esta isoenzima, presentarán niveles más altos y por consecuencia se incrementarán los efectos adversos e incluso se podrían presentar cuadros de toxicidad al incrementarse los niveles de fármaco inalterado, e inversamente, en individuos metabolizadores extensos, en los que hay una mayor expresión de CYP2D6, puede presentarse falla terapéutica. Por lo anterior, es particularmente importante establecer el fenotipo metabolizador, para aquellos fármacos con estrecho índice terapéutico.⁶⁶

Esparteína y debrisoquina sustratos de CYP2D6 se han utilizado como fármacos prueba para fenotipar a individuos como metabolizadores pobres (PM) ó metabolizadores extensos (EM).⁶⁷ El uso de debrisoquina y esparteína tiene algunas limitantes ya que presentan efectos adversos, los cuales se ven incrementados en individuos metabolizadores pobres, por lo que el bromhidrato de dextrometorfán, ha sido señalado como un sustrato ideal para fenotipar al CYP2D6 ya que se ha demostrado que la O-desmetilación de dextrometorfán a dextrorfán es mediada exclusivamente por el CYP2D6 y que su polimorfismo metabólico es similar al presentado por esparteína y debrisoquina.^{44,66}

Con base en lo anterior se eligió al dextrometorfán para caracterizar el fenotipo.

Considerando que México es una población mestiza, se decidió incluir en este estudio a cualquier individuo que estuviera interesado en participar. Al analizar los árboles genealógicos de los 43 voluntarios que participaron se encontró que 37 sujetos eran de ascendencia mestiza y que sólo 6 eran descendientes de otras nacionalidades.

En estudios previamente publicados,^{25,37,38,59,60,68-73} el fenotipo metabolizador se determinó a partir de la proporción metabólica entre dextrometorfán y dextrorfán total y debido a que el dextrorfán se elimina en orina como dextrorfán libre y conjugado glucoronido, fue necesario aplicar a las muestras urinarias una hidrólisis enzimática mediante la enzima β -glucuronidasa antes de realizar la extracción para así poder cuantificar al dextrorfán total. El dextrorfán libre se cuantificó a partir de muestras urinarias sin hidrólisis enzimática y el dextrorfán conjugado se cuantificó mediante la diferencia entre el dextrorfán total y el dextrorfán libre.





Discusión

Al realizar el análisis de los primeros 3 voluntarios se encontró que para llevar a cabo la hidrólisis se requerían 18 horas de incubación con la enzima β -glucuronidasa. No obstante también se cuantificó dextrorfán libre.

En la Fig. 5.1 se pueden identificar los cromatogramas correspondientes a los dos grupos de metabolizadores, en el inciso a) se puede ver el cromatograma del voluntario 38 quien se clasificó como un metabolizador pobre y en el cual se puede observar que la concentración de dextrometorfán ($4.24\mu\text{g/mL}$) es considerablemente más grande que la concentración de dextrorfán total ($0.2776\mu\text{g/mL}$), mientras que el cromatograma b) que corresponde al voluntario 22 quien se clasificó como metabolizador rápido, la concentración de dextrometorfán ($0.1162\mu\text{g/mL}$) es mucho más pequeña que la del dextrorfán ($57.59\mu\text{g/mL}$). Por lo tanto el método analítico fue útil para distinguir entre los dos fenotipos metabolizadores.



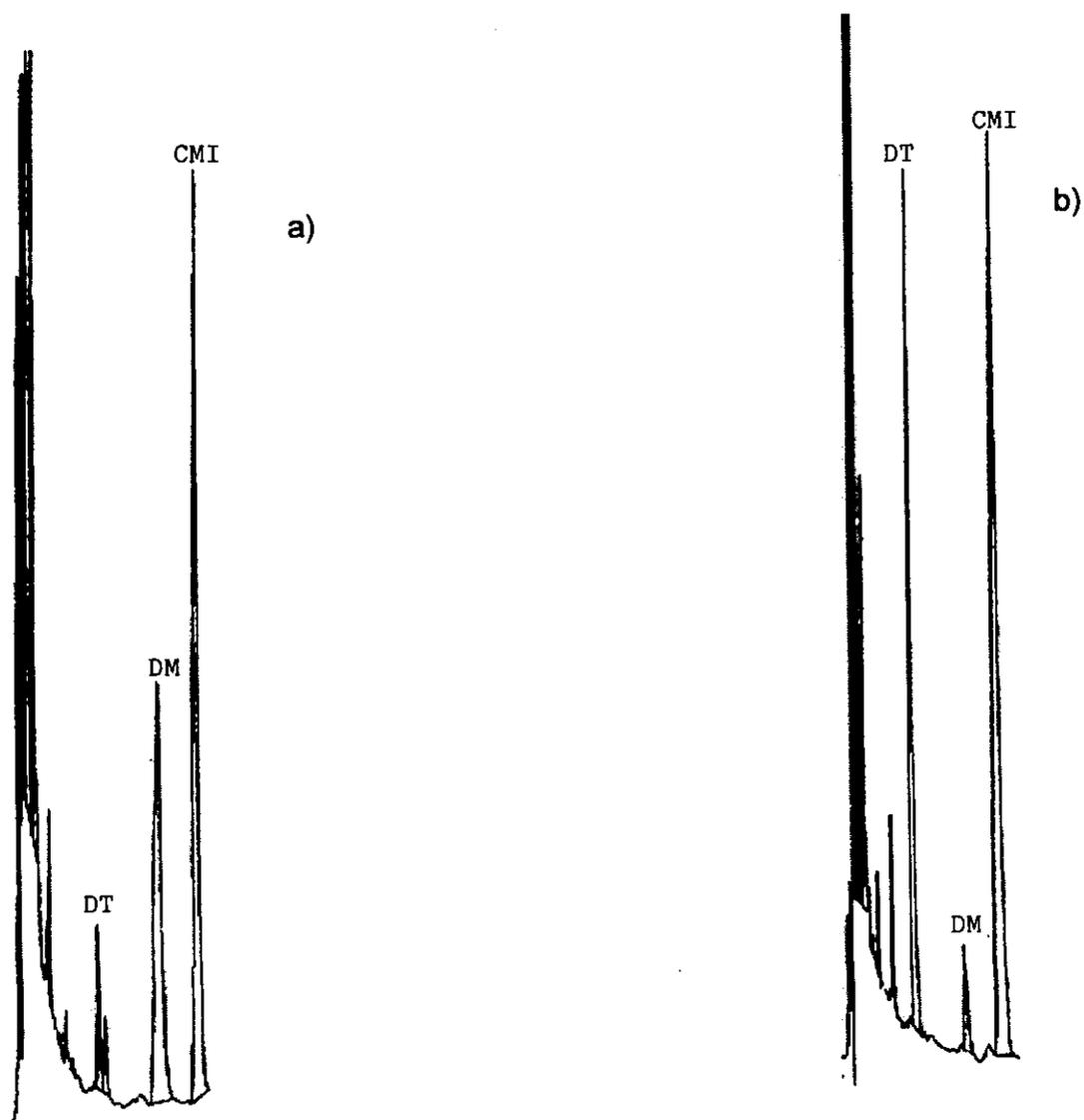


Fig. 5.1 Cromatogramas de voluntarios: a) metabolizador pobre y b) metabolizador rápido.





Discusión

En la **Tabla 4.16** se puede observar que hubieron concentraciones de dextrorfán fuera del rango de concentración utilizados en el método previamente validado, por lo que se decidió hacer una dilución 1:2 para aquellos voluntarios que presentaban concentraciones de dextrorfán mayores de 70 µg/mL.

Al determinar el fenotipo metabolizador se encontró que de los 43 voluntarios solamente uno presentó fenotipo de metabolizador pobre. Ello se estableció en base al criterio previamente reportado por Schmid y cols,²⁵ de que una proporción metabólica mayor de 0.3 establece a un metabolizador pobre y una menor de 0.3 señala a un metabolizador extenso, no obstante hubo una gran variabilidad interindividual en la proporción metabólica de dextrometorfán/dextrorfán total ya que el rango osciló entre 0.0010 y 15.2821.

Schmid y cols,²⁵ calcularon la antimoda de 0.3 mediante la proporción de dextrometorfán/dextrorfán total. Como se puede observar en la **Tabla 4.16** el fenotipo metabolizador pudiera ser determinado con la proporción de dextrometorfán/dextrorfán libre, y así evitar el paso enzimático del método analítico necesario para cuantificar el dextrorfán total, sin embargo sería necesario calcular la antimoda y así poder definir el criterio para distinguir entre metabolizadores pobres y extensos. Sin embargo para poder determinar esta antimoda sería necesario incrementar la población en estudio.

En la **Fig. 5.2** se puede observar la gráfica de distribución de metabolizadores pobres y metabolizadores extensos al graficar la proporción metabólica contra el número total de voluntarios, en ella se visualiza claramente la separación entre ambos fenotipos.

La frecuencia de 2.3% correspondiente a 1 metabolizador pobre encontrado entre los 43 voluntarios es más baja que la frecuencia encontrada en caucásicos americanos y europeos que es de 3.9 a 10% y mayor que el obtenido en poblaciones orientales, cuya frecuencia es de 1%.⁷⁰ Sin embargo, el número de sujetos fue muy pequeño por lo que es necesario incrementar el tamaño de la población para obtener resultados estadísticamente válidos.



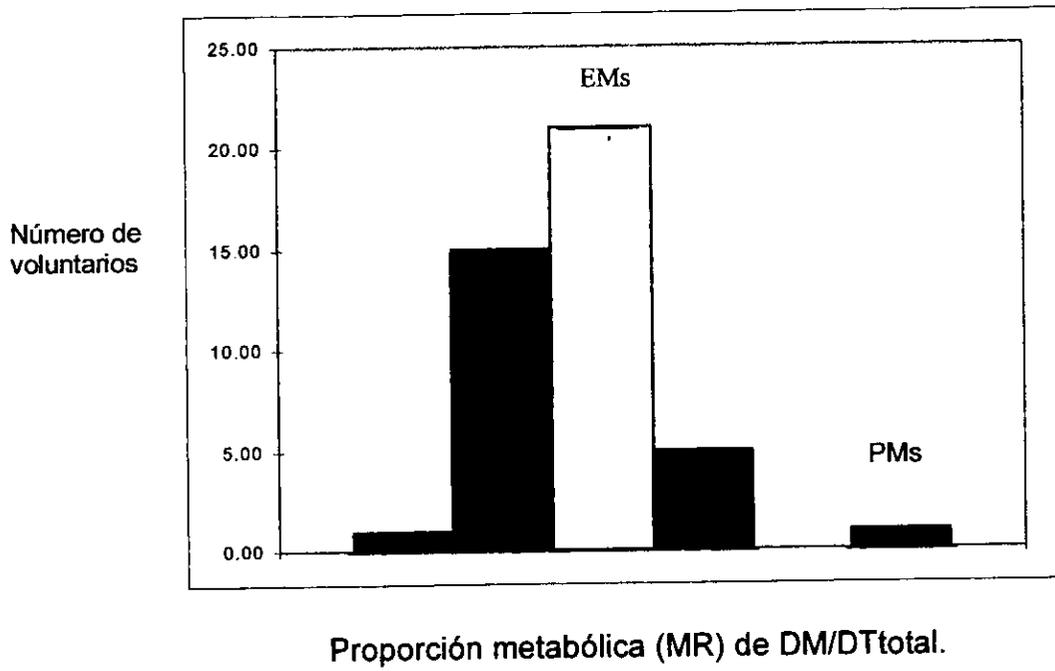


Fig. 5.2 Distribución de metabolizadores pobres y metabolizadores extensos



VI. Conclusiones





CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se puede concluir que el método para cuantificar dextrometorfán y dextrorfán en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución fue lineal, exacto y preciso en un rango de concentración de 0.1 a 6 $\mu\text{g/mL}$ para dextrometorfán y de 1 a 70 $\mu\text{g/mL}$ para dextrorfán, exacto, preciso, y las muestras fueron estables bajo las condiciones de experimentación, por lo que se consideró aplicable para la determinación del fenotipo metabolizador.

Con fundamento a los resultados del estudio del fenotipo metabolizador, se puede concluir que en la población bajo estudio predominan los metabolizadores rápidos. Es necesario aumentar el tamaño de la población para obtener resultados estadísticamente válidos y de esta manera contar con mayor información acerca de la proporción de metabolizadores pobres en nuestra población.





VII. Apéndices





APENDICE I

**DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR UTILIZANDO
DEXTROMETORFANO.**

HOJA DE CONSENTIMIENTO

NOMBRE: _____
 FECHA DE NACIMIENTO _____
 EDAD: _____ NACIONALIDAD: _____ SEXO: _____
 PESO _____ ESTATURA _____
 DIRECCION _____
 TELEFONO: _____.

Por medio del presente, doy mi consentimiento pleno y sin coacción de ninguna especie para participar en el estudio de dextrometorfán (jarabe). He recibido una copia del protocolo, la cual he leído, enterándome del procedimiento y posibles efectos secundarios del medicamento bajo estudio.

Estoy de acuerdo en participar y cooperar, tomando el medicamento y tratamiento como se me indique.

Nombre y firma del voluntario: _____

Nombre y firma del testigo: _____

Nombre y firma del investigador: _____

Nombre y firma del médico responsable _____

Lugar y fecha: _____





APENDICE II

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR UTILIZANDO DEXTROMETORFANO.

CUESTIONARIO DEL VOLUNTARIO

VOLUNTARIO No. _____

NOMBRE DEL VOLUNTARIO:

NOMBRE COMPLETO

INICIALES

EDAD: _____ SEXO: _____ PESO: _____

ESTATURA _____ NACIONALIDAD: _____

FECHA Y HORA REAL DE LA ADMINISTRACION: _____

VOLUMEN DE ORINA RECOLECTADA: _____

FECHA DE ANALISIS DE LAS MUESTRAS: _____

Conteste el siguiente cuestionario.

1. La semana previa al estudio, estuvo bajo tratamiento con algún medicamento?, si su respuesta es sí indique por favor el nombre de dicho medicamento. _____
2. ¿Ha ingerido pastillas anticonceptivas ó algún tratamiento hormonal en los últimos días? _____
3. ¿Es fumador?, si su respuesta es sí indique por favor el número de cigarrros que se fuma diario. _____
4. ¿Ingiere bebidas alcohólicas, café o té?, si su respuesta es sí indique con que frecuencia las consume. _____
5. Mencionar la nacionalidad de sus siguientes familiares.

Madre: _____

Padre: _____

Abuelo paterno: _____

Abuela paterna: _____

Abuelo materno: _____

Abuela materna: _____





APENDICE III

Características de los voluntarios que participaron en el estudio

NUM. DE VOL.	EDAD	SEXO	PESO (Kg)	ESTATURA (MTS)	FUMA
1	25	F	59	1.55	NO
2	49	F	60	1.70	NO
3	27	M	65	1.84	NO
4	28	F	61	1.72	NO
5	27	F	96	1.68	NO
6	27	F	47	1.54	NO
7	23	F	52	1.56	NO
8	29	F	46	1.57	NO
9	29	M	70	1.68	NO
10	26	F	62	1.63	NO
11	47	F	48	1.60	SI
12	28	F	54	1.57	NO
13	20	F	46	1.62	NO
14	34	F	56	1.64	NO
15	23	F	69	1.60	NO
16	24	M	60	1.62	NO
17	24	F	46	1.53	NO
18	21	F	56	1.58	NO
19	30	M	78	1.81	NO
20	52	F	49	1.55	NO
21	30	M	96	1.65	SI
22	37	M	73	1.70	NO
23	38	F	54	1.57	NO
24	24	F	56	1.60	NO
25	24	M	68	1.85	SI
26	15	M	64	1.68	NO
27	23	F	48	1.62	NO
28	28	F	63	1.54	NO
29	26	F	51	1.56	NO
30	18	M	80	1.86	NO
31	22	F	64	1.78	SI
32	33	F	48	1.56	NO
33	27	F	60	1.64	NO
34	25	M	76	1.74	NO
35	27	M	68	1.69	NO
36	26	F	68	1.75	NO
37	34	F	47	1.56	NO
38	25	M	83	1.71	SI
39	27	M	95	1.90	SI
40	25	M	70	1.68	NO
41	27	M	58	1.64	NO
42	29	M	87	1.76	SI
43	25	F	68	1.63	NO





ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII. Bibliografía





BIBLIOGRAFIA

1. Lou YC, **Diferences in drug metabolism polyphormism between orientals and caucasians**, Drug Metabolims Rev, 22(5), 451-475 (1990).
2. Steven JL, Kearns GL, **Pharmacogenetics in pediatrics**, Pediatric Clinics of North America, 44(1), 55-77, (1997).
3. Gibalid M, **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**, Lea & Febiger, London, 1991, pp.256.
4. Lennard MS, Tucker GT, Woods HF, **Inborn "errors" of drug metabolism; pharmacokinetics and clinical implications**, Clin Pharmacokinet,; 19, 257-263, (1990)
5. Linder MW, Prough RA, **Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency**, Clin Chem, 43(2), 254-266, (1997).
6. González FJ, Skoda RC, Dimura S, et al, **Charaterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquin metabolism**, Nature ; 33(31), 442-446. (1988)
7. Poulsen HE, Loft S. **The impact of genetic polymorphisms in risk assessment of drugs**, Arch Toxicol Suppl , 16, 211-212, (1994)
8. Aiache , Devissaguet, Guyot, **Biofarmacia**, Ed., El Manual moderno, México, D.F., 1983, pp.55.
9. González FJ, **Human cytochromes P450: problems and prospects**, Trends Pharmacol Sci, 13, 346-352, (1992).
10. Brosen K, **Drug-Metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry**, Ther Drug Monit, 18: 393-96, 1996
11. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, et al., **The P450 superfamily: update listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci**, DNA Cell Biol, 10, 1-4, (1991).
12. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al., **The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accesion numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature**, DNA Cell Biol, 12, 1-51, (1993).
13. Murray M, **P450 Enzymes, Inhibition Mechanisms, Genetic Regulation and Effects of Liver Disease**, Clin Pharmacokinetic Concepts, 23 (2), 132-146, (1992).
14. Shen WW, **The metabolism of psychoactive drugs: A review of enzymatic biotransformation and inhibition**, Biol Psychiatry, 41, 814-826, (1997).
15. Riesenman C, **Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 systems: A critical appraisal**, Pharmacotherapy, 15(6 Pt 2), 845-995, (1995).
16. González FJ.; **The Molecular Biology of Cytochrome P450**, Pharmacol Rev, (4), 243-288, (1989).
17. Forrester LM, Henderson CJ, Glancy MJ, et al: **Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics**. Biochem J, 281, 359, (1992.)





18. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al: **Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians.** J Pharmacol Exp Ther 270, 414, (1994.)
19. Wrighton SA, Stevens JC, **The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism,** CRC Crit Rev Toxicol , 22(1), (1992).
20. Rowland M, Tozer T, **Clinical pharmacokinetic concepts and application,** 3ra. ed., Lea & Febiger Book, Sn. Francisco, Calif., USA, 1995, pp.221.
21. Gaedigk A, AGAH Annual Meeting '99, **Ethnic factors: Implications for drug therapy and global drug development,** International J Clin Pharmacol Ther, 37(4), 193-206, (1999).
22. Vogel F, Motulsky AG. **Human genetics. Problem and approaches,** 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
23. Nei M, Saitou N. **Genetic relationship of human populations and ethnic differences in reactions to drugs and food** In: Kalow W, Goedde HW, agarwal DP, editors. **Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics** New York: Alan R. Liss, 1986, pp. 21-37.
24. Bertilsson L, **Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation,** Clin Pharmacokinet, 29 (3), 192-209, (1995.)
25. Schmid B, Bicher J, Presig R, et al, **Polymorphic dextrometorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquine hydroxylation.** Clin Pharmacol Ther, 38, 618, (1985.)
26. Dayer P, Leemann T, Striberni R: **Dextrometorphan O-demetylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P450 db1 activity.** Clin Pharmacol Ther 45(34), (1989.)
27. Brosen K, Gram LF. **Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism.** Eur J Clin Pharmacol, 36, 537-47, (1989)
28. Vincent-Viry M, Muller J, Fourier B, et al, **Relation between debrisoquine oxidation phenotype and morphological, biological and pathological variables in a large population,** Clin Chem, 37(3), (1991)
29. Brosen K, Gram LF. **First-pass metabolism of imipramine and desipramine: Impact of the sparteine oxidation phenotype.** Clin Pharmacol Ther, 43, 400-406, (1988).
30. Balant-Gorgia AE, Balant LP, Garrone G. **High blood concentrations of imipramine or clomipramine and therapeutic failure: a case report study using drug monitoring data,** Ther Drug Monit, 11, 415-420, (1989).
31. Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, et al, **Deletion of the entire cytochrome P4502D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism.** Am J Hum Genet, 48, 943-950., (1991).





32. Horowitz LN, Morganroth J. **Second generation antiarrhythmic agents, have we reached antiarrhythmic nirvana?** J Am Coll Cardiol, 9, 459-463, (1987).
33. Daly AK, Armstrong M, Monkman SC, et al, **Genetic and metabolic criteria for the assignment of debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P4502D6) phenotypes.** Pharmacogenetics, 1, 33-41, (1991).
34. Chen ZR, Somogyi AA, Bochner F, **Simultaneous determination of dextrometorphan and three metabolites in plasma and urine using High-Performance Liquid Chromatography with application to their disposition in Man,** Ther Drug Monit, 12, 97-104, (1990).
35. Barnhart JW, **The urinary excretion of dextrometorphan and three metabolites in dogs and humans,** Toxicol Appl Pharmacol , 55, 43-48, (1980).
36. Pfaff G, Briegel P, Lamprecht I, **Interindividual variation in the metabolism of dextromethorphan,** Int J Pharm, 14, 173-89, (1983).
37. K pfer A, Schmid B, Pfaff G, **Pharmacogenetics of dextrometorphan O-demethylation in man,** Xenobiotica, 16, 421-423, (1986).
38. Larrey D, Amouyal G, Tinel M, et al, **Polymorphism of dextrometorphan oxidation in a Frech population,** Br J Clin Pharmacol , 24, 676-679, (1987).
39. Clark DW, **Genetically determined variability in acetylation and oxidation, Therapeutic implications,** Drugs, 29, 342-375, (1985).
40. Jacqz E, Hall SD, Branch RA, **Genetically determined polymorphism in drug oxidation,** Hepatology ; 6, 1020-1032, (1986).
41. Roy SD, Hawes EM, Hubbard JW, et al, **Methoxyphenamine and dextrometorphan as safe probes for debrisoquine hydroxylation polymorphism.** Lancet , i, 1393, (1984)..
42. Woodworth JR, Rotenberg KS, Hisvark O, et al, **Bioequivalence of sustained release dextromethorphan (DELSYM) and the polymorphic metabolism of dextromethorphan.** J Clin Pharmacol , 24, 399-400, (1984).
43. K pfer A., Schmid B, Preisig R, et al, **Dextrometorphan as a safe probe for debrisoquine hydroxylation polymorphism.** Lancet, i, 517-518, (1984).
44. Jacqz-Aigran E, Funck-Bretano C, Cresteil T. **CYP2D6 and CYP3A-dependent metabolism of dextrometorphan in humans.** Pharmacogenetics, 3, 197-204, (1993).
45. Dayer P, Leemann T, Striberni R, **Dextrometorphan O-demethylation in human microsomes: a selective probe for the debrisoquine -type of oxidation polymorphism,** Experientia, 43, 701, (1987).
46. **Diccionario de Especialidades Farmac uticas,** Ed. 38^a, México, 1992. pp. 302, 332..
47. **Información de Medicamentos, USP DI, TOMO I,** España, 1989, pp.290-297.





48. Ramachander G, Williams FD, Emele JF. **Determination of dextrophan in plasma and evaluation of bioavailability of dextrometorphan hydrobromide in humans**, J Pharm Sci , 66, 1047-1048, (1977).
49. Dixon R, Carbone JJ, Mohacsi E, et al, **Dextrometorphan: radioimmunoassay and pharmacokinetics in the dog**, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 22, 243-255, (1978).
50. Furlanut M, Cima L., **Gas-Liquid chromatographic determination of dextromethorphan in serum and brain**. J Chromatogr, 140, 270-274, (1977).
51. Barnhart JW, Massad EN, **Determination of dextromethorphan in serum by gas chromatography**, J Chromatogr Biomed Appl, 163, 390-395, (1979).
52. Gillian R, Lanman RC, Mason WD. **High pressure liquid chromatographic determination of dextrophan in human plasma**, Anall Lett , 13:, 81-87, (1980).
53. Achari RG, Edema HM, Chin D, et al, **Determination of dextrometorphan and three metabolites in urine by chromatography by using semimicrobore columns**, J Pharm Sci, 73, 1821-1822, (1984).
54. Park YH, Kullberg MP, Hinsvark ON, **Quantitative determination of dextrometorphan and three metabolites in urine by reverse-phase high-performance liquid chromatography**. J Pharm Sci , 73, 24-29, (1984).
55. East T, Dye D. **Determination of dextrometorphan and metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**, J Chromatogr Biomed Appl, 420, 217-222, (1987).
56. Mascher H, **High-performance liquid chromatographic determination of dextrophan and 3-hidroxymorphinan in human plasma based on a selective pre-colum sample clean-up**, J Chromatogr Biomed Appl, 420, 217-222, (1987).
57. Johansson M, Svensson C, **Determination of dextromethorphan and its metabolites in plasma by dual column liquid chromatography and fluorimetric detection**, J Pharm Biomed Anal, 6, 211-220, (1988).
58. Guttendorf RJ, Wedlund PJ, Blake J, et al, **Simplified phenotyping with dextromethorphan by thin layer chromatography: application to clinical laboratory screening for deficiencies in oxidative drug metabolism**, Ther Drug Monit, 10, 490-498, (1988).
59. Shad VP, Midha KK, Dighe S, et al, **Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies**, J Pharm Sci, 81(3) , 309-312, (1992).
60. Marinac JS, Foxworth JW, Willsie SK, **Dextrometorphan polymorphic hepatic oxidation (CYP2D6) in healthy black American adult subjects**, Ther Drug Monit, 17, 120-124 (1995).





61. Hoskins JM, Shenfield GM, Gross AS, **Modified high-performance liquid chromatographic method to measure both dextromethorphan and proguanil for oxidative phenotyping**, J Chromatogr B, 696, 81-87, (1997).
62. Irshaid YM, Alhadidi HF, Latif A, et al, **Dextromethorphan metabolism in Jordanians: dissociation of dextromethorphan O-demethylation from debrisoquine 4-hydroxylation**, Eur J Drug Metabolism Pharmacokinet, 21,4, 01-307 (1996).
63. Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, et al, **Quantification of dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity**, J Chromatogr B, 678, 105-111, (1977).
64. Karnes H.T., Shiu G, Shah V., **Validation of bioanalytical methods**, Pharm Research 8(4) , 421-426, 1991.
65. **Norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998**, Diario oficial, México, viernes 7 de mayo de 1999.
66. Eichelbaum M., **Defective oxidation of drugs, pharmacokinetic and therapeutic implications**. Clin Pharmacokinet, 7, 1-22, (1982).
67. Jacqz E, Dulac H and Mathieu H., **Phenotyping polymorphic drug metabolism in the French Caucasian population**, Eur J Clin Pharmacol, 7, 167-171, (1988).
68. Henthorn TK, Benítez J, Avram MJ, Martínez G, Llerena A, Cobadela J, Krejcie TC and Gibbons RD , **Assessment of the debrisoquin and dextromethorphan phenotyping tests by gaussian mixture distribution analysis**, Clin Pharmacol Ther, 45, 328-333, (1989).
69. Hildebrand M, Seifert W, Reichenberger A, **Determination of dextromethorphan metabolizer phenotype in healthy volunteers.**, Eur J Clin Pharmacol, 36, 315-318, (1989).
70. Freche JP, Dragacci S, Petit AM, et al, **Development and ELISA to study the polymorphism of dextromethorphan oxidation in a French population**, Eur J Clin Pharmacol, 39, 481-485, (1990).
71. Lam YWF, Rodriguez SY, **HPLC determination of dextromethorphan and dextrophan for oxidation phenotyping by fluorescence and ultraviolet detection**, Ther Drug Monit, 15, 300-304, (1993).
72. Straka RJ, Hansen SR, Walker PF, **Comparison of the prevalence of poor metabolizer phenotype for CYP2D6 between 203 Hmong subjects and 280 white subjects residing in Minnesota**, Clin Pharmacol Ther, 58, 29-34, (1995).
73. Nagai N, Kawakubo T, Kanekko F, et al, **Pharmacokinetic and polymorphic oxidation of dextromethorphan in a Japanese population**, Biopharm Drug Disposition, 17, 421-433, (1996).

