

00524
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DEL CYP2D1 (HOMOLOGO DEL CYP2D6 EN HUMANO),
EN CEREBRO, RIÑON E HIGADO DE RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

P R E S E N T A :
CESAR } **ARIZMENDI MONTOYA.**



MEXICO D.F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA

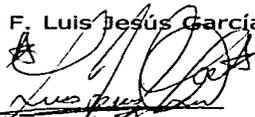
Jurado Asignado:

Presidente: **M. en C. INES FUENTES NORIEGA.**
Vocal: **Dra. HELGI HELEN JUNG COOK.**
Secretario: **M. en F. LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE.**
1er Suplente: **M. en C. SOFIA MARGARITA RODRIGUEZ ALVARADO.**
2do Suplente: **M en C. JOSE MANUEL MORALES HERNANDEZ.**

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Farmacocinética.
Torre de investigación, Sexto piso.
Facultad de Medicina.
Ciudad Universitaria, U.N.A.M.

Asesor del tema: M. en F. Luis Jesús García Aguirre.



Sustentante: César Arizmendi Montoya.

B

Dedico este trabajo de tesis especialmente a ti, Xochitl; por haberme motivado, empujado y aconsejado, gracias a todo eso y mas estoy aquí, algún día volveremos a estar juntos. ¡Te quiero mucho hermanita chochill!

A mi querida mamá Raquel: Gracias Ma, por darme tú cobijo y ayuda en todo momento, te quiero mucho.

A mi querido papa Leopoldo: cambiaste tu vida y la mía en un momento clave, por tu apoyo, tus enseñanzas, tus regaños, te quiero mucho Pa.

A mi hermana Leticia: por haber hecho cambios en mi vida que me han ayudado a crecer como persona y me allentan a seguir haciéndolo. Échale ganas mi querida abogacha!

A Jorge: por el sabio consejo y ayuda que he recibido de ti en todo momento, muchas gracias.

A mis sobrinos favoritos Aldo y Gina: aldote, ginota gracias por sus sonrisas, enojos, juegos, bromas que en los momentos difíciles me hacían recordar lo básico de la vida, gracias.

A Moisés: por la confianza, enseñanza, consejo, ayuda y por compartir tus proyectos haciéndome participe de ellos, gracias.



A mi querida Delia Abad, eres alguien especial en mi vida, espero que esto continúe creciendo, te quiero mucho.

A las grandes familias Arizmendi y Montoya.

A mi amigo y maestro Luis García: porque me enseñaste sin pretender obtener algo a cambio, por la paciencia que me tuviste, por la motivación y sobre todo por toda la ayuda que me brindaste, por todo eso muchas gracias.

A mis amigos de la prepa 9: Diana, Wendy, Alvaro. Gracias por ser mis amigos incondicionales, saber escuchar y brindarme su mano amiga en todo momento, de todo corazón, muchas gracias.

A mis amigos del Colegio Chris y Alfredo, gracias por todos los momentos de risa y bromas, los quiero mucho.

A los amigos que se han quedado en el camino: Jose Alberto, Kim, Haydee, Ulises, Rodrigo, Berenice, Miguel, Astrid, Rita, Cristina.

A la familia Canul Sánchez: por su ayuda y amistad desinteresada.

A mis compañeros de la Facultad de Química, en especial a Adriana, Viviana, Charly, Augusto, Miguel, Abraham, Guillermo

A mis tesisas, Mayra y Nelson, gracias por su amistad y por sus enseñanzas. Gracias.



A Elsa y Elvia por su valiosa ayuda en la cuantificación de las proteínas microsomales.

Al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo durante la obtención de proteínas microsomales.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Farmacocinética: Liz, Abraham, Marybela, Champs-Elysées, Vero, Oli, Chinis-winnis, y a todos aquellos que en algún momento estuvieron cerca. A todos ustedes muchas gracias.

A mi querida Facultad de Química, UNAM. Mi carrera te la debo a ti Universidad.

A las ratas que utilice para llevar a cabo este trabajo. ¡Lo siento!

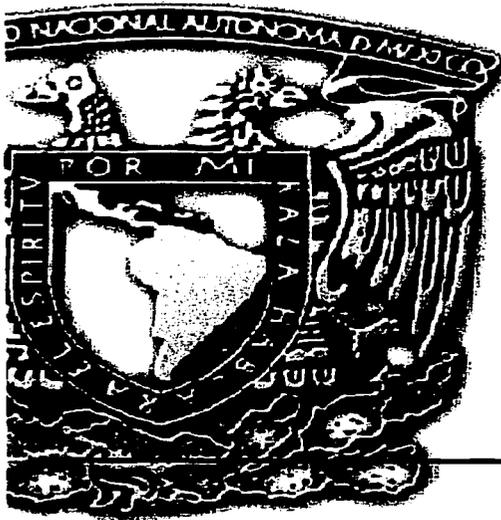
En general a toda la gente que me ha hecho crecer como persona.

Muchas gracias a todos.

Noviembre 2003.



INDICE .



INDICE

INDICE

Índice General.

	Página	
1.	RESUMEN.	1
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.	4
2.1	Antecedentes.	5
2.2	Objetivo principal.	6
2.3	Objetivos secundarios.	6
3.	GENERALIDADES.	8
3.1	Dextrometorfán.	9
3.1.1	Generalidades.	9
3.1.2	Propiedades físicoquímicas.	10
3.1.3	Farmacocinética.	11
3.2	Cinética enzimática.	14
3.2.1	Cinética de Michaelis-Menten.	16
3.2.2	Transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten.	22
3.2.2.1	Grafica de Lineweaver-Burk (doble recíproca).	22
3.2.2.2	Grafica de Eadie Hofstee.	27
3.3	Validación de métodos analíticos.	30
3.3.1	Linealidad.	30
3.3.2	Precisión.	32
3.3.2.1	Repetibilidad.	32
3.3.2.2	Reproducibilidad intralaboratorio.	33
3.3.3	Exactitud.	33
3.3.4	Límite de cuantificación.	34
3.3.5	Límite de detección.	34



INDICE

	Página
3.3.6	Recuperación absoluta. 35
3.3.7	Estabilidad de la muestra procesada. 35
4.	PARTE EXPERIMENTAL. 36
4.1	Optimización del método para cuantificar proteínas en preparados microsomales. 38
4.1.1	Equipos e instrumentos. 38
4.1.2	Reactivos. 38
4.1.3	Sustancias de referencia. 39
4.1.4	Preparación de soluciones. 39
4.1.5	Método de Bradford. 41
4.2	Validación del método para cuantificar proteínas en preparados microsomales. 43
4.2.1	Linealidad del método. 43
4.2.2	Precisión del método. 43
4.2.2.1	Repetibilidad del método. 44
4.2.2.2	Reproducibilidad del método. 44
4.2.3	Exactitud del método. 45
4.3	Obtención de proteínas microsomales de tejido hepático, renal y cerebral. 46
4.3.1	Equipos e instrumentos. 46
4.3.2	Reactivos. 46
4.3.3	Preparación de soluciones. 47
4.3.4	Metodología seguida. 47
4.4	Optimización del método analítico para cuantificar dextrorán mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 49
4.4.1	Equipos e instrumentos. 49
4.4.2	Reactivos. 50
4.4.3	Sustancias de referencia. 50
4.4.4	Preparación de soluciones. 50



INDICE

	Página
4.4.5	Optimización de la fase móvil. 51
4.4.6	Columna cromatográfica. 52
4.5	Validación del método analítico para cuantificar dextrorrán mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 53
4.5.1	Preparación de la curva patrón. 53
4.5.2	Validación del sistema. 55
4.5.2.1	Linealidad. 55
4.5.2.2	Precisión. 55
4.5.3	Validación del método. 56
4.5.3.1	Linealidad. 56
4.5.3.2	Precisión. 56
4.5.3.2.1	Repetibilidad. 57
4.5.3.2.2	Reproducibilidad. 57
4.5.3.3	Exactitud. 58
4.5.3.4	Límite de cuantificación y detección. 58
4.5.3.5	Recobro o recuperación absoluta. 59
4.5.3.6	Estabilidad de muestra procesada. 60
4.6	Determinación de la actividad enzimática del CYP2D1 en tejido renal, hepático y cerebral de rata. 61
4.6.1	Equipos e instrumentos. 61
4.6.2	Reactivos. 61
4.6.3	Sustancias de referencia. 62
4.6.4	Preparación de soluciones. 62
4.6.5	Metodología seguida. 62
5.	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS. 70
5.1	Validación del método para cuantificar proteínas en preparados microsomales. 71
5.1.1	Linealidad del método. 71
5.1.2	Precisión y exactitud del método. 75



INDICE

	Página
5.1.2.1	Repetibilidad y exactitud intradia del método. 75
5.1.2.2	Reproducibilidad y exactitud interdia del método. 77
5.2	Cuantificación de proteínas microsomales en tejido hepático, renal y cerebral. 79
5.3	Optimización del método para cuantificar dextrorfán mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 80
5.4	Validación del método para cuantificar dextrorfán mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 81
5.4.1	Linealidad y precisión del sistema. 82
5.4.2	Linealidad del método. 85
5.4.3	Precisión y exactitud del método. 87
5.4.3.1	Repetibilidad. 87
5.4.3.2	Reproducibilidad. 88
5.4.4	Límite de cuantificación y detección. 89
5.4.5	Recobro o recuperación absoluta. 91
5.4.6	Estabilidad de la muestra procesada. 92
5.5	Determinación de la actividad enzimática del CYP2D1 en tejido renal, hepático y cerebral de rata. 94
6.	CONCLUSIONES. 101
7	BIBLIOGRAFIA. 105
	APENDICES. 110



INDICE

Índice de Tablas.

	Página
Tabla 1 Preparación de la curva para la cuantificación de proteínas.	41
Tabla 2 Preparación de la curva de calibración para dextrorfan en presencia de proteína.	54
Tabla 3 Ejemplo de concentración de metabolito a través del tiempo para diferentes concentraciones de sustrato	66
Tabla 4 Resultados absorbancia del metodo para cuantificar proteínas en preparados microsomas.	72
Tabla 5 Linealidad del método para la cuantificación de proteínas microsomas.	73
Tabla 6 Repetibilidad y exactitud intradia del método para cuantificación de microsomas.	75
Tabla 7 Reproducibilidad y exactitud interdia del método para la cuantificación de microsomas.	77
Tabla 8 Concentración microsomal final para cada tejido.	79
Tabla 9 Condiciones cromatográficas finales.	80
Tabla 10 Linealidad del sistema para dextrorfan.	82
Tabla 11 Precisión del sistema para dextrorfan.	83
Tabla 12 Linealidad del método para dextrorfan.	85
Tabla 13 Repetibilidad para dextrorfan.	87
Tabla 14 Reproducibilidad del método para dextrorfan.	88
Tabla 15 Limite de cuantificación y detección para dextrorfan.	89
Tabla 16 Recuperación absoluta para dextrorfan.	91
Tabla 17 Estabilidad de muestra procesada para dextrorfan.	92
Tabla 18 Comparativo de constantes enzimáticas.	98



INDICE

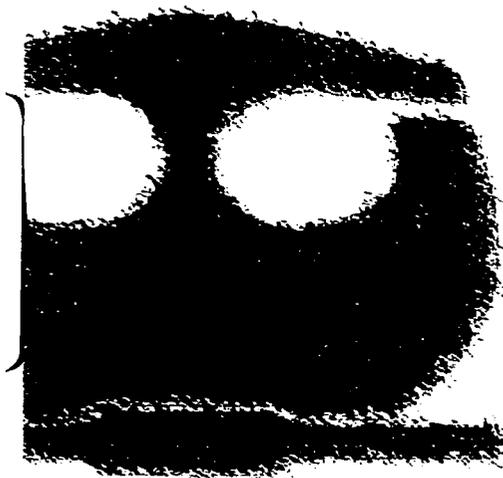
Índice de Figuras.

	Página
Figura 1 Estructura química del dextrometorfán.	10
Figura 2 Vías metabólicas del dextrometorfán.	13
Figura 3 Reacción enzimática.	14
Figura 4 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción enzimática.	16
Figura 5 Grafica de Lineweaver-Burk.	24
Figura 6 Inhibición enzimática usando la grafica de Lineweaver-Burk.	26
Figura 7 Grafica de Eadie Hofstee.	28
Figura 8 Metodología para cuantificar microsomas según Bradford M.M.	42
Figura 9 Metodología para procesar tejido hepático, renal y cerebral.	48
Figura 10 Cinética enzimática para dextrometorfán.	64
Figura 11 Ejemplo de grafica de concentración de dextrorfán versus tiempo.	67
Figura 12 Ejemplo de grafica de velocidad inicial (V_0) versus concentración de dextrorfán.	68
Figura 13 Linealidad del método para la cuantificación de proteínas microsomales.	74
Figura 14 Cromatograma de dextrorfán y dextrometorfán.	81
Figura 15 Linealidad del sistema para dextrorfán.	84
Figura 16 Linealidad del método para dextrorfán.	86
Figura 17 Grafica de Michaelis-Menten.	95
Figura 18 Grafica de Lineweaver-Burk.	96
Figura 19 Grafica de Eadie-Hofstee.	97



Capítulo 1.

RESUMEN .



Capítulo 1.

RESUMEN

El presente proyecto tuvo la finalidad de caracterizar la actividad enzimática del CYP2D1 (homólogo del CYP2D6 en humano) en tejido renal, hepático y cerebral de rata y de esta manera establecer las diferencias metabólicas entre cada tejido. Para ello se requirió un método analítico que fuera capaz de cuantificar a dextrorfán (metabolito del dextrometorfán), usando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

La cinética enzimática fue determinada en microsomas de rata, usando dextrometorfán como sustrato y β -HADPH como coenzima. El nivel de dextrorfán en cada tejido fue medido haciendo uso de un método analítico validado bajo los parámetros de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de cuantificación, límite de detección, recuperación absoluta y estabilidad de la muestra procesada, como se indica en la norma oficial mexicana NOM-177-SSA-1998.

Los resultados mostraron una mayor actividad metabólica en el tejido hepático, le sigue el renal y finalmente el cerebral, obteniéndose



RESUMEN

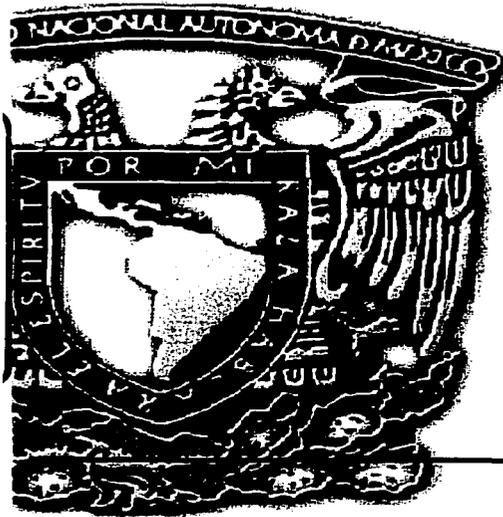
valores promedio de la relación V_{max}/K_m de 27.65×10^{-5} , 7.12×10^{-5} y $0.37 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ respectivamente.

Los valores promedio de la constante de Michaelis-Menten (K_m) para tejido hepático, cerebral y renal son 3.44, 2.35 y 3.56 mM respectivamente. En cuanto a la constante de velocidad máxima con que se lleva a cabo la catálisis enzimática (V_{max}) para tejido hepático, cerebral y renal, es 9.5×10^{-4} , 0.13×10^{-4} y $1.65 \times 10^{-4} \text{ mM/seg}$, respectivamente.



Capítulo 2.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.



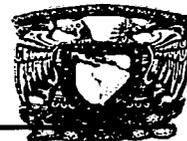
Capítulo 2

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

2.1 ANTECEDENTES.

El sistema de citocromos P450, realiza el metabolismo de la mayoría de los fármacos, el CYP2D6 (homologo del CYP2D1 en rata) metaboliza alrededor del 20 % de los fármacos que involucran CYPs, tales como antiepilépticos, de ahí la importancia de contar con modelos *in vitro* para el estudio del comportamiento enzimático en diversos tejidos y que permiten a futuro caracterizar posibles interacciones farmacológicas a nivel metabólico.

El estudio de la actividad de CYP2D1 en rata puede proporcionar mucha información acerca de los órganos y tejidos responsables de algún tipo de mecanismo de biotransformaciones de fármacos. Esto lleva a plantear los siguientes objetivos:



2.2 OBJETIVO PRINCIPAL

- ❖ Determinar las diferencias relacionadas con actividad enzimática del citocromo CYP2D1 en tejido hepático, renal y cerebral.

2.3 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ❖ Optimizar un método para cuantificar proteínas microsomales, y determinar el contenido existente en cada tejido (riñón, cerebro e hígado) de ratas; y validar este método de acuerdo a los parámetros de la norma oficial mexicana NOM 177-SSA-1-1998.
- ❖ Optimizar un método para cuantificar dextrorfan, en preparados microsomales provenientes de tejido hepático, renal y cerebral, y validar este método de acuerdo a los parámetros de la norma oficial mexicana NOM 177-SSA-1-1998.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

- ❖ **Determinación de la actividad enzimática de O-desmetilación de dextrorfán en microsomas, en hígado, riñón y cerebro de ratas Wistar adultas.**



Capítulo 3.

GENERALIDADES.



Capítulo 3.

GENERALIDADES

3.1 DEXTROMETORFAN.

3.1.1 GENERALIDADES.

El dextrometorfán (d-3-metoxi-N-metilmorfinán) es el d-isomero del análogo de la codeína levorfanol; sin embargo, a diferencia del l-isomero, carece de propiedades analgésicas o de potencial de adicción y no actúa en los receptores de opioides. El fármaco ejerce una acción central para elevar el umbral de la tos. En estudios controlados se ha demostrado su eficacia en pacientes con tos patológica; su potencia es casi igual a la de la codeína. En comparación con esta última, el dextrometorfán produce menos efectos adversos subjetivos y gastrointestinales. En dosificaciones terapéuticas, no inhibe la actividad ciliar, y sus efectos antitusivos persisten durante cinco o seis horas. Su toxicidad es baja, pero las dosis demasiado altas pueden producir depresión del SNC ⁽¹⁾.

El dextrometorfán suprime el reflejo de la tos por acción directa en el centro tusígeno del bulbo raquídeo. Sus efectos adversos son somnolencia, mareos y náusea ⁽²⁾.



3.1.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS ⁽³⁾.

En la figura 1, se muestra la estructura química del dextrometorfán.

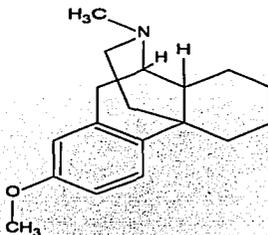


Figura 1. Estructura química del dextrometorfán.

El nombre químico del bromhidrato de dextrometorfán es el morfina, 3-metoxi-17-metil-,(9a, 13a, 14a)- bromhidrato, monohidratado. Su peso molecular es de 370.3 g/mol, mientras que su fórmula condensada es $C_{18}H_{25}NO \cdot HBr \cdot H_2O$.

Su descripción corresponde a la de cristales blancos, con olor débil, funde a los 125° C con descomposición, su pKa es de 8.3



En relación a su solubilidad se sabe que 1 g es soluble en alrededor de 65 mL de agua, y 1 g en 10 mL de etanol, completamente soluble en cloroformo e insoluble en éter.

3.1.3 FARMACOCINETICA.

Al administrarse por vía oral el dextrometorfán se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal, presentando un inicio de acción rápida, observándose ésta a los 20 o 30 minutos de su ingestión ⁽⁴⁾.

El dextrometorfán es metabolizado mediante el sistema citocromo CYP2D6 en humanos y su homólogo CYP2D1 en ratas, a dextrorfán y 3-metoximorfina, este último mediante el CYP3A4. Estos son sus principales metabolitos ⁽⁵⁻⁷⁾.

El CYP2D6 al igual que su homólogo CYP2D1, han mostrado tener actividad al metabolizar carcinógenos y neurotoxinas, tales como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina y la 1,2,3,4-tetrahidroquinolina ⁽⁸⁾.

El CYP2D6 metaboliza muchos fármacos incluyendo antidepresivos, serotina y varias anfetaminas ⁽⁸⁾.



GENERALIDADES

Algunos fármacos que se ha demostrado que son biotransformados por CYP2D6 son ⁽⁹⁾:

- ❖ Ajmalina.
- ❖ Amitriptilina.
- ❖ Bufaralol.
- ❖ Bupranolol.
- ❖ Citalopram.
- ❖ Clomipramina.
- ❖ Clorpromazina.
- ❖ Codeína.
- ❖ Debrisoquina.
- ❖ Deprenilo.
- ❖ Desipramina.
- ❖ Dextrometorfan.
- ❖ Fluoxetina.
- ❖ Haloperído.
- ❖ Imipramina.
- ❖ Propanolol.
- ❖ Tamoxifeno.

En la figura 2 se muestran los metabolitos de dextrometorfán ⁽⁷⁾.



GENERALIDADES

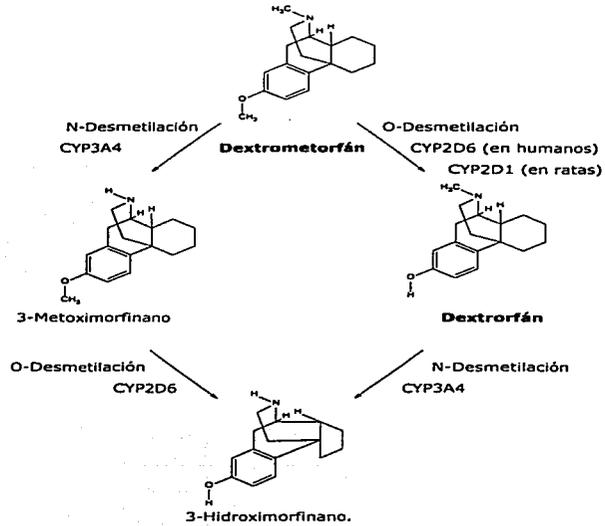


Figura 2. Vías metabólicas del dextrometorfán.



3.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.

Las enzimas son proteínas que realizan la catálisis de las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos. Aunque las reacciones enzimáticas obedecen a los mismos principios de la cinética química, se diferencian de éstas por el hecho de que las enzimas son saturadas por los sustratos. Durante una reacción enzimática, el sustrato (S) se une químicamente a la enzima (E) para formar un complejo "enzima-sustrato" (ES) (figura 3). Después de llevarse a cabo varias reacciones químicas, el complejo (ES) se rompe para dar origen al producto (P), liberando a la enzima (E), que puede volver a iniciar otro ciclo catalítico. Estas reacciones son reversibles. ⁽¹⁰⁾



Figura 3. Reacción enzimática.

En 1913, Michaelis y Menten desarrollaron la teoría cinética general que explica el comportamiento de las reacciones enzimáticas ⁽¹⁰⁾.

El análisis cuantitativo de la actividad enzimática, o cinética enzimática, puede proporcionar información útil acerca de la forma en que actúan las enzimas. Dicho análisis cinético también permite



GENERALIDADES

comparaciones entre enzimas diferentes o de la misma enzima según diversas condiciones. Para muchas enzimas la velocidad de catálisis, o velocidad de reacción (V) varía de acuerdo a la concentración molar del sustrato $[S]$ cuando es baja. Cuando $[S]$ es alta, (V) es casi independiente de $[S]$ ⁽¹¹⁾.

Una característica muy importante de la actividad enzimática es su especificidad, de manera que cada enzima particular actúa solo sobre un determinado sustrato, las enzimas suelen ser tan específicas que son incapaces de actuar sobre sustancias estrechamente relacionadas, por ejemplo sobre un estereoisomero de la misma molécula ⁽¹²⁾.

Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que residuos de aminoácidos. Otras requieren un componente químico adicional llamado cofactor, el cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos, o un complejo orgánico o metaloorgánico llamado coenzima ⁽¹³⁾.

Las determinaciones cinéticas de reacciones catalizadas enzimáticamente se encuentran entre las técnicas más poderosas para elucidar los mecanismos catalíticos de las enzimas ⁽¹⁴⁾.



3.2.1 CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN ⁽¹³⁾.

La figura 4 representa la relación entre $[S]$ y V_o en una reacción enzimática. La curva que expresa esta relación tiene la misma forma general para muchas enzimas. La forma hiperbólica de esta curva se puede expresar algebraicamente mediante la ecuación de Michaelis-Menten, partiendo de la hipótesis básica de que el paso limitante de velocidad en las reacciones enzimáticas es la descomposición del complejo (ES) para formar el producto (P) y la enzima libre (E).

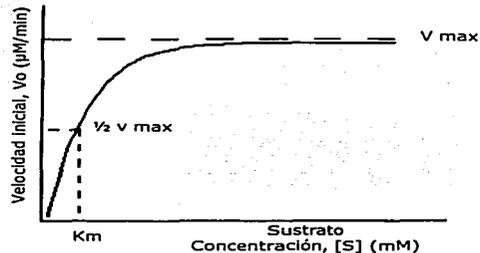


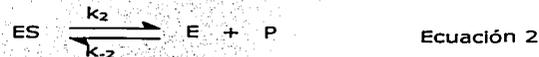
Figura 4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción enzimática.



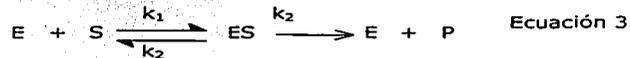
GENERALIDADES

Los términos importantes son [S], V_0 , V_{max} y una constante llamada constante de Michaelis-Menten o K_m . Todos estos términos se pueden medir fácilmente de manera experimental.

Para la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten, esta se inicia con dos reacciones básicas que intervienen en la formación y descomposición de [ES] (ecuación 1 y 2).



En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto [P] es insignificante y se hace la suposición de que puede ignorarse k_{-2} . La reacción se reduce a:



V_0 se determina por la descomposición de ES para dar P y que viene fijada por [ES]:



GENERALIDADES

$$V_o = k_2 [ES]$$

Ecuación 4

Dado que $[ES]$ de la ecuación 4 no se puede medir experimentalmente con facilidad, se comienza por encontrar una expresión alternativa para $[ES]$. En primer lugar se introduce el término $[E_t]$ que representa la concentración total de enzima (la sumatoria de la enzima libre y enzima unida al sustrato). La enzima libre o no fijada, se puede representar, por tanto, como $[E_t] - [ES]$. Además, debido a que $[S]$ es extraordinariamente mucho mayor que $[E_t]$, la cantidad de sustrato fijado por la enzima en cualquier momento de la reacción es insignificante comparado con la $[S]$ total. De acuerdo a estas consideraciones, los siguientes pasos llevan a una expresión de V_o en función de parámetros que se miden fácilmente.

Las velocidades de formación y descomposición de ES vienen determinadas por las constantes de velocidad k_1 (formación) y $k_{-1} + k_2$ (descomposición) según las expresiones:

$$\text{Velocidad de formación de } ES = k_1 ([E_t] - [ES]) [S]$$

Ecuación
5

$$\text{Velocidad de descomposición de } ES = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Ecuación
6



GENERALIDADES

Un supuesto es que la velocidad inicial de reacción refleja un estado estacionario en el que $[ES]$ es constante, es decir, la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de descomposición. A esto se le denomina suposición de estado estacionario. Las expresiones de las ecuaciones 5 y 6, pueden igualarse a un estado estacionario dando:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad \text{Ecuación 7}$$

Se realizan una serie de pasos algebraicos para resolver la ecuación 7 en función de $[ES]$. Se resuelve el factor común en el miembro de la izquierda y se simplifica el segundo miembro dando:

$$k_1 [E_t][S] - k_1 [ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{Ecuación 8}$$

Sumando el término $k_1 [ES][S]$ a ambos lados de la ecuación y simplificando:

$$k_1 [E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2) [ES] \quad \text{Ecuación 9}$$

Despejando $[ES]$ se obtiene.

$$[ES] = \frac{k_1 [E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad \text{Ecuación 10}$$



GENERALIDADES

Esta expresión aun se puede simplificar mas de forma que se combinan todas las constantes de velocidad en una expresión.

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2) / k_1} \quad \text{Ecuación 11}$$

El término $(k_{-1} + k_2) / k_1$ se define como constante de Michaelis-Menten, K_m . Sustituyendo ahora en la ecuación 11, la expresión se simplifica a:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + K_m} \quad \text{Ecuación 12}$$

Se puede expresar ahora V_o en función de $[ES]$. La ecuación 12 se utiliza para sustituir $[ES]$ en la ecuación 4, dando:

$$V_o = \frac{k_2 [E_t][S]}{[S] + K_m} \quad \text{Ecuación 13}$$

Esta ecuación aun se puede simplificar más. Dado que se obtiene la velocidad máxima cuando la enzima esta saturada y $[ES]$



GENERALIDADES

V_{max} se puede definir como $k_2 [E_t]$. Sustituyendo esto en la ecuación 13 da:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad \text{Ecuación 14}$$

Esta es la ecuación de Michaelis-Menten, la ecuación de velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente con un sustrato. Es una definición de la relación cuantitativa entre la velocidad inicial (V_o), la velocidad máxima inicial (V_{max}) y la concentración inicial del sustrato [S], todos ellos relacionados a través de la constante de Michaelis-Menten (K_m).

La velocidad máxima inicial (V_{max}) nos indica la velocidad máxima de la reacción enzimática; por otro lado la constante de Michaelis-Menten (K_m) significa la concentración de sustrato que es catalizado al llevarse a cabo el 50 % de la velocidad máxima de la reacción.

Un parámetro adicional es el factor de actividad el cual es la relación de la constante V_{max} y K_m ; este nos indica la rapidez con que una enzima y su sustrato reaccionan, o bien la afinidad entre una enzima y su sustrato ^(6,9).



GENERALIDADES

La ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 14) puede transformarse algebraicamente en formas que son útiles en la determinación práctica de K_m y V_{max} .

3.2.2 TRASFORMACIONES DE LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN.

Se han deducido y utilizado transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, con la finalidad de facilitar la determinación de V_{max} y K_m ; como se muestra a continuación:

3.2.2.1 GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK (DOBLE RECIPROCA) ⁽¹³⁾.

La ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad \text{Ecuación 14}$$

Se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales. Una transformación c



GENERALIDADES

deduce simplemente tomando los inversos en ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten, obteniéndose.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{[S] + K_m}{V_{max} [S]} \quad \text{Ecuación 15}$$

Separando los componentes del numerador en el segundo miembro de la ecuación da.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]} \quad \text{Ecuación 16}$$

Que se simplifica a:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Esta ecuación es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten denominada ecuación de Lineweaver-Burk. Para las enzimas que obedecen a la ecuación de Michaelis-Menten la gráfica de $1/V_o$ versus $1/[S]$ da una línea recta (figura 5). Esta línea tiene una pendiente igual a K_m/V_{max} , la intersección sobre el eje $1/V_o$ es $1/V_{max}$ y la intersección sobre el eje $1/[S]$ es igual a $-1/K_m$. La presentación



GENERALIDADES

recíproca también denominada Lineweaver-Burk, tiene la gran ventaja de permitir una determinación mucho mas precisa de V_{max} , la cual solo puede ser obtenida aproximadamente a partir de una gráfica simple de V_o versus $[S]$.

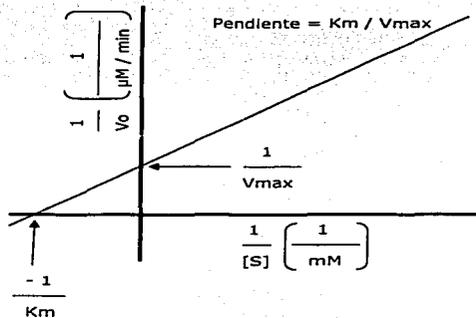


Figura 5. Grafica de Lineweaver-Burk

La grafica de Lineweaver-Burk de las velocidades de reacción es muy útil para distinguir entre ciertos tipos de mecanismos de reacción enzimáticos, así como para analizar la inhibición enzimática, y determinar si se trata de una inhibición competitiva o no competitiva. Para realizar esto, se llevan a cabo dos grupos de experimentos.



GENERALIDADES

velocidad en los que la concentración de enzima se mantiene constante. En el primer grupo $[S]$ también se mantiene constante, lo que permite medir el efecto del incremento de la concentración de inhibidor $[I]$ sobre la velocidad inicial V_0 . En el segundo grupo $[I]$ se mantiene constante y se varía $[S]$.

En la figura 6 se muestran el conjunto de graficas de Lineweaver-Burk obtenidas en ausencia de inhibidor y dos a concentraciones diferentes de un inhibidor competitivo. El incremento de $[I]$ da lugar a la producción de una familia de líneas con una intersección en el eje $1/V_0$, pero con pendientes diferentes. Debido a que la intersección sobre el eje $1/V_0$ es igual a $1/V_{max}$, se puede ver que V_{max} no cambia en presencia del inhibidor competitivo. Así, independientemente de la concentración de un inhibidor competitivo, hay siempre una concentración del sustrato suficientemente elevada para desplazar al inhibidor del sitio activo de la enzima.

En la inhibición no competitiva, representaciones similares de los datos de velocidad dan la familia de líneas, que tienen una intersección común en el eje de $1/[S]$. Esto indica que K_m para el sustrato no se altera por el inhibidor no competitivo mientras que V_{max} disminuye (figura 6).



GENERALIDADES

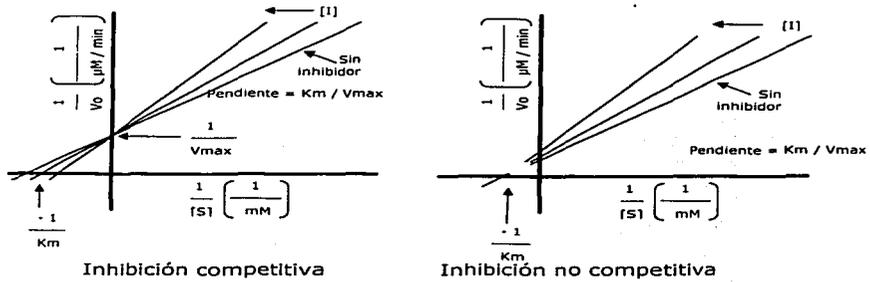
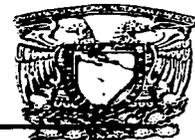


Figura 6. Inhibición enzimática usando la gráfica de Lineweaver-Burk.



3.2.2.2 GRAFICA DE EADIE-HOFSTEE ⁽¹⁵⁾.

La ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Para comenzar la transformación algebraica de la ecuación de Lineweaver-Burk, se comienza por multiplicar por $V_o V_{max}$ a ambos miembros de la ecuación.

$$V_{max} = V_o K_m \frac{1}{[S]} + V_o \quad \text{Ecuación 18}$$

Que se simplifica a.

$$V_{max} = K_m \frac{V_o}{[S]} + V_o \quad \text{Ecuación 19}$$

Arreglado la ecuación se obtiene:

$$V_o = -K_m \frac{V_o}{[S]} + V_{max} \quad \text{Ecuación 20}$$



GENERALIDADES

Esta ecuación es una transformación de la ecuación de Lineweaver-Burk denominada ecuación de Eadie-Hofstee. Para las enzimas que obedecen a la ecuación de Michaelis-Menten la grafica de V_o versus $V_o/[S]$ da una línea recta con pendiente negativa, que es igual a $-K_m$, la intersección sobre el eje V_o es V_{max} , y la intersección sobre el eje $V_o/[S]$ es V_{max}/K_m (figura 7).

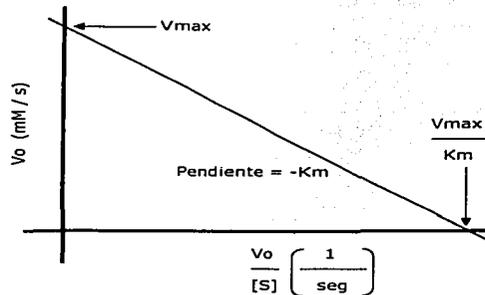


Figura 7. Grafica de Eadie-Hofstee

La principal desventaja de esta grafica es que el termino V_o aparece tanto en las ordenadas como en la abcisas. Generalmente se le



GENERALIDADES

usa como un parámetro adicional para corroborar los valores de las cortantes (K_m y V_{max}) obtenidas a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk.



3.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS ⁽¹⁷⁾.

La validación es la evidencia experimental documentada que incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica, es adecuado para cumplir con el propósito para el cual fue diseñado.

Antes de emplear un método para un análisis de muestras, el analista debe obtener suficientes datos que evalúen el desempeño y la capacidad del método para conseguir resultados confiables, esto se lleva a cabo mediante un estudio de validación.

La NOM-177-SSA-1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, recomienda validar un método analítico bajo los siguientes criterios:

3.3.1 LINEALIDAD.

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se evalúa la linealidad del método. De acuerdo a las especificaciones, el método se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99.



GENERALIDADES

El coeficiente de correlación se obtiene mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en donde se utiliza la siguiente fórmula:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Donde: r = coeficiente de correlación
 x = concentración
 y = respuesta

Para calcular el error relativo debido a la regresión se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Error relativo} = (S_y/x) / \bar{y}$$

$$S_y/x = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \text{pendiente}(\sum xy) - \text{ordenada}(\sum y)}{n - 2}}$$

Donde: S_y/x = varianza
 \bar{y} = respuesta promedio
 y = respuesta
 x = concentración
 n = número de datos



3.3.2 PRECISION.

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, evaluando repetibilidad y reproducibilidad.

3.3.2.1 REPETIBILIDAD.

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para considerar un método repetible, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%. El cálculo del coeficiente de variación se realiza mediante la siguiente ecuación

$$C. V. = Sx / \bar{x}$$
$$Sx = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Donde: Sx = Desviación estándar
 \bar{x} = concentración promedio
 x = concentración
 n = número de datos



3.3.2.2 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO.

Es la precisión de un método analítico en donde se expresa la variación obtenida entre las determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como los días, equipo, columnas o analistas. Un método es reproducible siempre y cuando el coeficiente de variación no sea mayor al 15%.

3.3.3 EXACTITUD.

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina mediante la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel de la curva, con respecto a la concentración nominal de la muestra y para calcularla se emplea la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desv. absoluta} = 100 \times \frac{|(\text{Conc. nominal} - \text{Conc. experimental promedio})|}{\text{Conc. nominal}}$$



Para que el método se considere como exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe encontrarse dentro del 15% del valor nominal de concentración.

3.3.4 LIMITE DE CUANTIFICACION.

Se define como la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse, cumpliendo con la exactitud y precisión establecidas en el método. Se establece que tiene validez como límite de cuantificación cuando el valor promedio de las cinco repeticiones se encuentran dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 20%.

3.3.5 LIMITE DE DETECCION.

Se define como la mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Como límite de detección se considera aquella concentración cuya respuesta es de 2 a 4 veces la señal del ruido de fondo.



3.3.6 RECUPERACIÓN ABSOLUTA.

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Se evalúa determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración, el cual debe ser consistente en cada nivel dentro del rango de concentraciones.

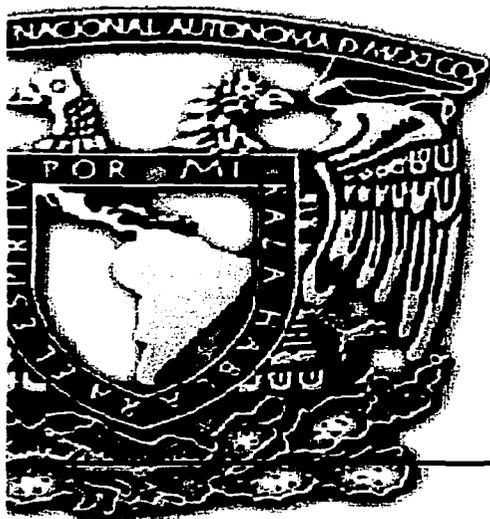
3.3.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA.

Es la propiedad, de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis, para las mismas condiciones de manejo y almacenamiento. Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración que presento la misma muestra inyectada al tiempo inicial o tiempo cero; esta debe ser menor al 15%.



Capítulo 4.

PARTE EXPERIMENTAL.



Capítulo 4.

PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se dividió en cuatro etapas:

- ❖ Optimización y validación del método para cuantificar proteínas en preparados microsomales.
- ❖ Cuantificación de proteínas microsomales en tejidos hepático, renal y cerebral.
- ❖ Optimización y validación del método analítico para cuantificar dextrorfán mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- ❖ Determinación de la actividad enzimática del CYP2D1 en tejido renal, hepático y cerebral de rata.



4.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR PROTEINAS EN PREPARADOS MICROSOMALES.

De acuerdo a información bibliográfica, este método fue desarrollado por Bradford M.M. ⁽¹⁸⁾

4.1.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza marca OHAUS Analytical Estándar, modelo AS120S.
- Espectrofotómetro marca Beckman, modelo DU 650.
- Potenciómetro modelo pH 1000 Series, marca OAKTON.
- Agitador tipo vortex marca Thermolyne, modelo MaxiMix II M37615

4.1.2 REACTIVOS.

- Azul brillante de Coomassie G marca Sigma, lote 80K7007, 90 % de pureza.
- Cloruro de sodio marca J. T. Baker, lote L38C58, 100 % de pureza.
- Alcohol etílico absoluto anhidro marca J. T. Baker, lote L38C56, 100 % de pureza.
- Ácido fosfórico marca J. T. Baker, lote M46C52, 85 % de pureza.



PARTE EXPERIMENTAL

- Fosfato de sodio dibásico anhidro marca J. T. Baker, lote L04462, 100 % de pureza.

4.1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

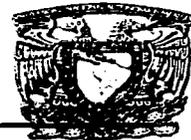
- Albúmina serica bovina marca Sigma, lote 100K7415, 99 % de pureza.

4.1.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Reactivo de Bradford.

Pesar con exactitud 100 mg de azul brillante de Coomassie G, transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 50 mL de alcohol etílico al 95 %, y adicionar 100 mL de ácido fosfórico al 85 %. Esta mezcla se lleva a volumen con agua destilada.

La concentración final de azul brillante de Coomassie G es de 0.01 % (w/v), 4.7 % de alcohol etílico, y 8.5 % de ácido fosfórico.



PARTE EXPERIMENTAL

- Solución de cloruro de sodio 0.15 M.

Pesar con exactitud 0.8700 g de cloruro de sodio, transferirlos a un matraz de 100 mL, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. La concentración de esta solución es de 0.15 M.

- Solución de albúmina serica bovina 1000 µg/mL.

Pesar con exactitud 10 mg de albúmina serica bovina, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con solución de cloruro de sodio 0.15 M. La concentración de esta solución es de 1000 µg/mL.

- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4

Pesar con exactitud 1.42 g de fosfato de sodio dibásico, transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua desionizada, llevar a volumen con agua destilada.

La concentración final de fosfato de sodio dibásico es de 10 mM, verificar el pH de la solución, de ser necesario ajustar el pH a 7.4 con ácido fosfórico.



4.1.5 METODO DE BRADFORD.

La curva patrón se preparó considerando cinco concentraciones en el rango de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$, y tres controles de calidad de concentraciones 8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$. Todas estas fueron preparadas de acuerdo a lo señalado en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la curva para la cuantificación de proteínas

5	5	95
8*	8	92
10	10	90
25	25	75
40*	40	60
50	50	50
75	75	25
80*	80	20
100	100	0

* Puntos de control de calidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



PARTE EXPERIMENTAL

El volumen total de muestra fue de 100 μL . Se partió de la solución de albúmina serica bovina de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se adicionó la alícuota en un tubo de ensaye de 10 mL, después se completo el volumen con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.4.

De acuerdo a Bradford M. M. ⁽¹⁸⁾, en la figura 8 se muestra la metodología empleada.

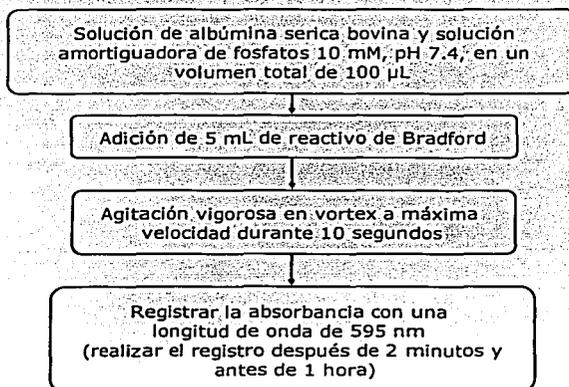


Figura 8. Metodología para cuantificar proteínas microsomas, según Bradford M. M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



4.2 VALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICAR PROTEINAS EN PREPARADOS MICROSOMALES.

4.2.1 LINEALIDAD DEL METODO.

La linealidad del método se determinó, con la preparación de tres curvas de calibración a partir de pesadas independientes de albúmina serica bovina, en el intervalo de concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Se elaboró una grafica para cada curva, absorbancia versus concentración de albúmina. En cada curva se determina, empleando un ajuste de mínimos cuadrados, el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). El coeficiente de correlación debe de ser mayor a 0.99

4.2.2 PRECISION DEL METODO

Para evaluar la precisión, esta se realiza mediante repetibilidad o precisión intradia, así como reproducibilidad o precisión interdia.



4.2.2.1 REPETIBILIDAD DEL METODO.

La repetibilidad del método se determinó en un mismo día de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipo, analista y laboratorio. Para esto se preparan por quintuplicado tres niveles de concentración 8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$, que corresponden a los niveles bajo, medio y alto del rango de la curva de calibración. A los resultados de concentración recuperada para cada punto control, se les determina matemáticamente el promedio, la desviación estándar, porcentaje del coeficiente de variación. El por ciento del coeficiente de variación no debe exceder un 15 %.

4.2.2.2 REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

Para evaluar este parámetro, se prepararon por duplicado los niveles de concentración correspondientes a los niveles bajo, medio y alto del rango de la curva de calibración (8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$), durante tres días continuos de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipos y laboratorio. A los resultados de concentración recuperada para cada punto control, se les determinó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación, para cada nivel de concentración. La variación entre valores no debe exceder un 15 %.



4.2.3 EXACTITUD DEL METODO.

Para evaluar este parámetro, a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la desviación absoluta de las concentraciones recuperadas promedio obtenidas para los puntos control, con respecto a la concentración nominal correspondiente. El porcentaje de desviación no debe exceder el 15 %.



4.3 OBTENCION DE PROTEINAS MICROSOMALES DE TEJIDO HEPATICO, RENAL Y CEREBRAL.

El método empleado, es el descrito por Tyndale ⁽⁸⁾.

4.3.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza marca OHAUS Analytical Estándar, modelo AS120S.
- Espectrofotómetro marca Beckman, modelo DU 650.
- Ultracentrífuga marca Beckman Coulter, modelo Optima L80K3
- Potenciómetro modelo pH 1000 Series, marca OAKTON.
- Vortex marca Thermolyne, modelo MaxiMix II M37615

4.3.2 REACTIVOS.

- Solución TRIS pH 7.4 marca Sigma
- Fosfato de sodio dibásico anhidro marca J. T. Baker, lote L04462, 100 % de pureza.



4.3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4

Pesar con exactitud 1.42 g de fosfato de sodio dibásico, transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua desionizada, llevar a volumen con agua destilada.

La concentración final de fosfato de sodio dibásico es de 10 mM, verificar el pH de la solución, de ser necesario ajustar el pH a 7.4 con ácido fosfórico.

4.3.4 METODOLOGIA SEGUIDA.

De acuerdo a Tyndale ⁽⁸⁾, la metodología que se siguió, se muestra en la figura 9.



PARTE EXPERIMENTAL

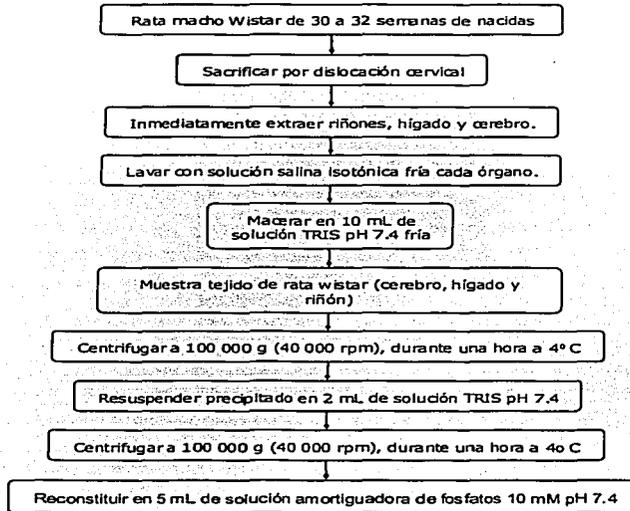


Figura 9. Metodología para procesar tejido hepático, renal y cerebral

Las proteínas así obtenidas se cuantificaron utilizando la técnica de Bradford.



4.4 OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR DEXTRORFAN MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

4.4.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters, acoplado con detector de fluorescencia Waters.
 - o Bomba cuaternaria modelo 600 marca Waters
 - o Desgasificador modelo 6324 marca Degassit.
 - o Inyector automatizado modelo 717 plus marca Waters.
 - o Detector de fluorescencia modelo 474 marca Waters.
 - o Estación de computo DELL, con paquete computacional Millenium 32 v 3.20, Waters.
- Centrífuga eppendorf modelo 5415C marca Eppendorf.
- Ultracongelador HARRIS modelo FLT-7LS-90a14, marca Harris manufacturing.
- Agitador tipo vortex marca Thermolyne, modelo MaxiMix II M37615
- Balanza analítica modelo OAHUS AS-120, Marca OHAUS.
- Potenciómetro modelo pH 1000 Series, marca OAKTON.
- Parrilla con calentador/agitador magnético modelo 220, marca VWR Scientific.



PARTE EXPERIMENTAL

- Micropipeta repetidora modelo Plus Pipette, marca Eppendorf.
- Micropipeta manual de volumen variable 10-100 μL , marca Eppendorf.
- Micropipeta manual de volumen variable 100-1000 μL , marca Eppendorf.
- Ultrasonido modelo FS20, marca Fisher Scientific.
- Sistema para filtración Millipore con membrana de 0.45 mm

4.4.2 REACTIVOS.

- Acetonitrilo grado HPLC, marca J.T. Baker.
- Alcohol metílico grado HPLC, marca Mallinckrodt.
- Agua desionizada grado HPLC.
- Ácido perclórico marca J.T. Baker.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro marca J. T. Baker, lote L04462, 100 % de pureza

4.4.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

- Dextrorfán, marca Ultrafine Chemicals, lote 043/113/1, 100 % de pureza.



4.4.4 PREPARACION DE SOLUCIONES.

- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 3.5

Pesar con exactitud 1.42 g de fosfato de sodio dibásico, transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua desionizada, llevar a volumen con agua destilada.

La concentración final de fosfato de sodio dibásico es de 10 mM, verificar el pH de la solución, ajustar el pH a 3.5 con ácido fosfórico.

4.4.5 OPTIMIZACION DE LA FASE MOVIL.

En la fase móvil empleada, los picos de interés tendrán que tener valor de simetría menor a dos, resolución mayor a 1.5, factor de capacidad mayor a dos, y platos teóricos mayores a 2000, para esto se modificó pH, porcentaje de fase móvil, velocidad de flujo así como la solución amortiguadora.



4.4.6 COLUMNA CROMATOGRAFICA.

Para el caso de la columna cromatográfica, se buscó una columna que permitiera detectar al dextrorfan en un tiempo adecuado de análisis, además que presentara una buena simetría y definición; para ello se evaluaron diferentes columnas cromatográficas con diferentes porcentajes de carbono.



4.5 VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR DEXTRORFAN MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA-1-1998⁽¹⁷⁾, la validación del método se llevo a cabo de la siguiente manera:

4.5.1 PREPARACION DE LA CURVA PATRON

La curva de calibración consta de siete puntos, los cuales tienen la siguiente concentración: 0.0125, 0.025, 0.1, 1, 5,10 y 25 $\mu\text{g/mL}$, de dextrorfán. Los puntos de control de calidad, son 0.5, 7.5 y 20 $\mu\text{g/mL}$, para los controles bajo, medio y alto respectivamente; estos valores, como se observa se encuentran dentro del intervalo de la curva de calibración. La preparación de cada uno de estos puntos para la curva de calibración, así como para los controles se describe en la tabla 2.



PARTE EXPERIMENTAL

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para dextrorfán en presencia de proteína.

0.0125	165	20	30	5		
0.025	160	20	30	10		
0.1	130	20	30	40		
0.5*	150	20	30		20	
1*	130	20	30		40	
5*	150	20	30			20
7.5*	140	20	30			30
10	130	20	30			40
20*	90	20	30			80
25	70	20	30			100

* Puntos control de calidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



4.5.2 VALIDACION DEL SISTEMA.

4.5.2.1 LINEALIDAD.

La linealidad del sistema fue determinada, preparando a partir de pesadas independientes, dos curvas de calibración de dextrorfan, para un intervalo de 0.0125 a 25 $\mu\text{g/mL}$. Estas curvas fueron preparadas en solución de Acetonitrilo:agua 20:80 (v/v).

Una vez que se obtuvieron los resultados correspondientes, se graficó el área de los picos correspondientes versus la concentración. Los parámetros matemáticos que se determinaron a estas curvas, en base a un ajuste por mínimos cuadrados, son: el coeficiente de correlación (r), pendiente (m), ordenada al origen (b) y el porcentaje del error relativo de la regresión. El coeficiente de variación debe ser mayor a 0.99

4.5.2.2 PRECISION

Para evaluar a este parámetro se tomaron los resultados que se obtuvieron de la prueba de linealidad, en los cuales se obtiene para cada curva el porciento del coeficiente de variación del factor de respuesta (pseudopendiente).



4.5.3 VALIDACION DEL METODO.

4.5.3.1 LINEALIDAD

Para la evaluación de este parámetro, se prepararon tres curvas de calibración de dextrorfán, a partir de pesadas independientes en un rango de concentraciones que va de 0.0125 a 25 $\mu\text{g/mL}$. A partir de los resultados se grafico la respuesta con respecto a la concentración y se aplicó una regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b), de cada curva. El coeficiente de correlación debe de ser mayor a 0.99

4.5.3.2 PRECISION.

El parámetro de precisión es evaluado a partir de la prueba de repetibilidad y reproducibilidad como se indica a continuación:



4.5.3.2.1 REPETIBILIDAD

Para evaluar este parámetro, las pruebas correspondientes se llevaron a cabo en un mismo día, conservando las mismas condiciones, de analista, equipo y laboratorio.

Para este fin, se analizaron las tres concentraciones de los puntos control de calidad (0.5, 7.5 y 20 $\mu\text{g/mL}$), cada una por quintuplicado y preparados a partir de pesadas independientes. A los datos correspondientes se les determinó el promedio, la desviación estándar, así como el porcentaje del coeficiente de variación, para cada nivel de concentración.

4.5.3.2.2 REPRODUCIBILIDAD.

Para la evaluación de este parámetro, se tomaron los resultados de los tres puntos control de tres días de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista. A los resultados correspondientes se les determinó el promedio, la desviación estándar, así como el porcentaje del coeficiente de variación, para cada nivel de concentración.



4.5.3.3 EXACTITUD.

A partir de los resultados de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales, con respecto a la concentración nominal, para cada nivel de concentración, para lo cual se emplea la siguiente ecuación matemática:

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

El por ciento de desviación no debe exceder el 15 %.

4.5.3.4 LIMITE DE CUANTIFICACION Y DETECCION.

El límite de cuantificación es la concentración de dextrorfan, en donde es cuantificado con exactitud y precisión. Para determinar este valor, fue preparada la parte baja de la curva, en presencia de proteína, por quintuplicado (0.0125 y 0.25 µg/mL).



PARTE EXPERIMENTAL

Para el límite de detección, se consideró que la señal de dextrorfan tuviera una señal de dos a cuatro veces mayor a la señal de ruido, para ello se consideraron diluciones a partir de la concentración mas baja del límite de cuantificación esperado (0.0125 µg/mL).

4.5.3.5 RECOBRO O RECUPERACION ABSOLUTA

Para llevar a cabo esta prueba, se preparó por triplicado las concentraciones correspondientes a los puntos control de calidad en sus niveles bajo, medio y alto (0.5, 7.5 y 20 µg/mL) respectivamente, en presencia de dextrorfan, disuelto en solución agua:acetonitrilo 80:20 v/v (muestra sistema). Así mismo se preparó muestra en presencia con proteína por triplicado a las cuales se les aplico la técnica de extracción (muestra método).

En cada nivel de concentración, se calculó el promedio para las muestras sistema y método; una vez realizado este calculo, se empleo la siguiente formula matemática:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Promedio muestra método.}}{\text{Promedio muestra sistema.}} * 100$$



PARTE EXPERIMENTAL

El cálculo anterior se hizo para los tres niveles control de calidad. Se calcula la desviación de los recobros individuales con respecto al recobro promedio, y este no debe ser mayor al 15 %.

4.5.3.6 ESTABILIDAD DE MUESTRA PROCESADA.

Para esta prueba, se prepararon por duplicado los puntos control de calidad en los niveles bajo, medio y alto. Para evaluar el tiempo en que estas muestras permanecerán estables se inyectaron al tiempo cero, y a las 15 horas posteriores. Durante este lapso de tiempo, las muestras fueron conservadas dentro del carrusel del modulo 717 (inyector automático Waters). Al final las concentraciones respectivas de los tres niveles fueron comparadas con respecto a las concentraciones presentadas al tiempo cero.



4.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL CYP2D1 EN TEJIDO RENAL, HEPATICO Y CEREBRAL DE RATA.

4.6.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza marca OHAUS Analytical Estándar, modelo AS120S.
- Potenciómetro modelo pH 1000 Series, marca OAKTON.
- Agitador tipo vortex marca Thermolyne, modelo MaxiMix II M37615
- Centrifuga Eppendorf modelo 5415C, marca Eppendorf.
- Baño maría marca Aquabath

4.6.2 REACTIVOS.

- β -NADPH marca Sigma
- Ácido perclórico marca J.T. Baker.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro marca J. T. Baker, lote L04462, 100 % de pureza.



4.6.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

- Clorhidrato de dextrometorfán, 100.1 % de pureza.

4.6.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4

Pesar con exactitud 1.42 g de fosfato de sodio dibásico, transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua desionizada, llevar a volumen con agua destilada.

La concentración final de fosfato de sodio dibásico es de 10 mM, verificar el pH de la solución, de ser necesario ajustar el pH a 7.4 con ácido fosfórico.

4.6.5 METODOLOGIA SEGUIDA.

Para la comparación de la cinética enzimática en los diferentes tejidos estudiados, se emplearon doce ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se ha demostrado que son metabolizadores rápidos ⁽⁶⁻⁸⁾. Asimismo de las 30 a 32 semanas de nacidas han alcanzado la madurez.



PARTE EXPERIMENTAL

adulta y la madurez de su sistema enzimático. Se obtuvieron los microsomas hepáticos, renales y cerebrales siguiendo la técnica de Tyndale, mostrada en la figura 9.

De cada preparado microsomal hepático, cerebral y renal se toma 1 mL y se mezclan entre sí, dando un volumen final de 12 mL. Finalmente a cada una se le cuantifica la cantidad de microsomas presentes.

El método que se empleó para determinar el perfil de la actividad enzimática para cada tejido se describe a continuación (figura 10).



PARTE EXPERIMENTAL

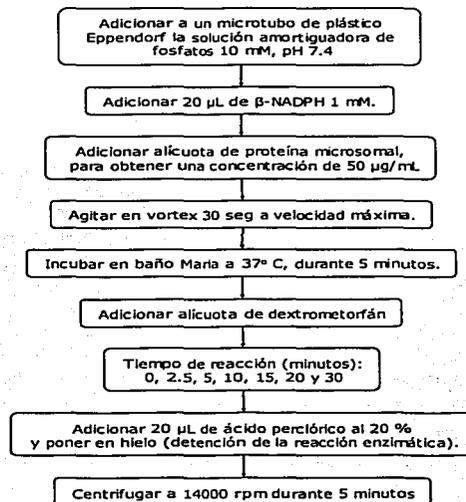


Figura 10. Cinética enzimática para dextrometorfán.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



PARTE EXPERIMENTAL

Las alícuotas del sustrato dextrometorfán fueron equivalentes a 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Cada nivel de concentración fue preparado siete veces, con la finalidad de detener la reacción a los tiempos 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.

Una vez que se determinó la concentración de dextrorfán en cada muestra se procedió a realizar el análisis matemático para calcular el valor de las constantes V_{max} y K_m , así como el factor de actividad V_{max}/K_m , para cada uno de los tejidos como se muestra a continuación:

- a) Contar con los resultados de concentración de metabolito (dextrorfán) a través del tiempo, esto para diferentes concentraciones de sustrato (dextrometorfán), como por ejemplo.



Tabla 3. Ejemplo de concentración de metabolito a través del tiempo para diferentes concentraciones de sustrato

Concentración Sustrato (mM)	0.0675	0.1350	0.2701	0.6751	1.3503	2.0254	2.7005
Tiempo (seg)							
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
150	0.0006	0.0011	0.0024	0.0073	0.0114	0.0127	0.0161
300	0.0013	0.0021	0.0045	0.0114	0.0247	0.0272	0.0290
600	0.0026	0.0050	0.0088	0.0233	0.0429	0.0514	0.0295
900	0.0047	0.0079	0.0140	0.0356	0.0513	0.0578	0.0344
1200	0.0058	0.0092	0.0177	0.0429	0.0651	0.0596	0.0400
1800	0.0088	0.0154	0.0290	0.0485	0.0662	0.0647	0.0504

Los resultados de dextrorfán tienen que tener las unidades mM. Para ello, a partir de los datos que arroja el equipo cromatográfico, obtener los valores en concentración (interpolando en la curva de calibración correspondiente), las unidades de estos valores deberán ser µg/mL. Finalmente a estos últimos se les divide por la masa molecular del dextrorfán (356.3 g/mol), lo que arroja un valor de concentración de dextrorfán con unidades mmol/L o mM.

- b) Realizar las graficas correspondientes de concentración de dextrorfán (mM), versus tiempo (seg), esta graf



PARTE EXPERIMENTAL

compuesta por dos zonas lineales, la de interés para nuestros fines es la primer zona, en donde la pendiente corresponderá al parámetro velocidad inicial (V_0). Al final tenemos el mismo numero de graficas que el numero de concentraciones de sustrato (dextrometorfán).

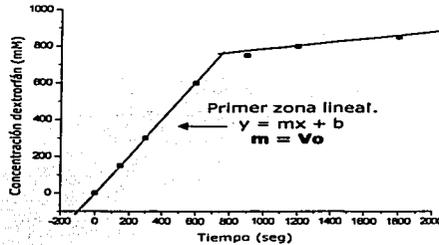


Figura 11. Ejemplo de grafica de concentración de dextrometorfán versus tiempo.

- c) Una vez que tenemos las V_0 , para las diferentes concentraciones de sustrato (dextrometorfán), se grafica la velocidad inicial ó V_0 (mM/seg) versus la concentración de dextrometorfán (mM). Esta es la grafica de Michaelis-Menten. En este caso es una sola grafica para cada tejido estudiado.



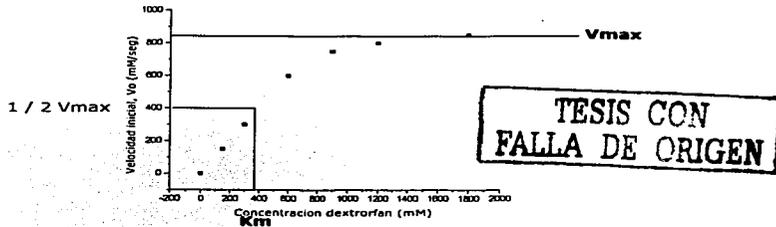


Figura 12. Ejemplo de grafica de velocidad inicial (V_o) versus concentración de dextrorfán.

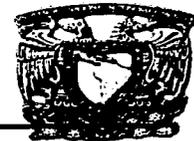
En esta grafica se pueden obtener las constantes K_m y V_{max} a partir de la curva obtenida.

- d) Transformación de Lineweaver-Burk. A partir de los datos de velocidad inicial, y concentración de dextrorfán, se obtiene la función inversa de cada uno. Se grafica $1 / V_o$ versus $1 / [\text{dextrorfán}]$. Esta grafica corresponde a la de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk.
- e) Transformación de Eadie Hofstee. Para obtener esta grafica se obtiene la relación de $V_o / [\text{dextrorfán}]$; se grafica $V_o / [\text{dextrorfán}]$ versus V_o . Se obtiene la grafica de Eadie Hofstee.



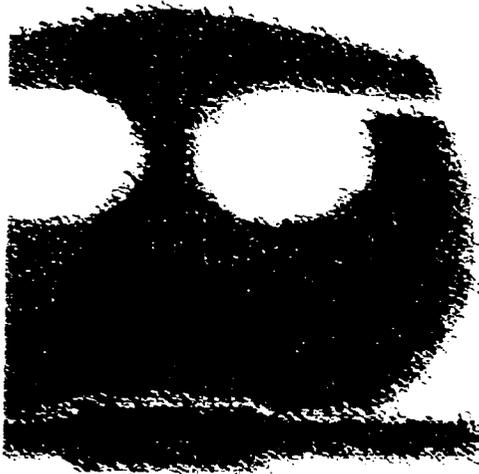
PARTE EXPERIMENTAL

- f) Para calcular el factor de actividad solo se determina la relación de V_{max}/K_m a partir de las constante obtenidas anteriormente.



Capítulo 5.

**RESULTADOS Y ANALISIS
DE RESULTADOS.**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 5.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

**5.1 VALIDACION DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR
PROTEINAS EN PREPARADOS MICROSOMALES.**

5.1.1 LINEALIDAD DEL METODO

En la tabla 4 se muestran los resultados de linealidad del método para la cuantificación de microsomas, asimismo en la figura 13, se muestra la grafica correspondiente al graficar el logaritmo natural de la absorbancia versus la concentración, en el intervalo de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteína (albúmina serica bovina). Se usa el ajuste matemático de logaritmo natural para los valores de absorbancia, y de esta manera obtener una línea recta (tabla 5).



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla 4. Resultados absorbancia del método para cuantificar proteínas en preparados microsomales.

5	0.1758	0.1706	0.1728	0.1731	0.0026	1.5082
10	0.1906	0.1915	0.1908	0.1910	0.0005	0.2475
25	0.2565	0.2559	0.2580	0.2568	0.0011	0.4212
50	0.4469	0.4452	0.4480	0.4467	0.0014	0.3158
75	0.7329	0.7359	0.7309	0.7332	0.0025	0.3432
100	1.2425	1.2424	1.2438	1.2429	0.0008	-0.0628

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla 5. Linealidad del método para la cuantificación de proteínas microsomales.

5	1.7384	1.7687	1.7556	1.7542
10	2.16576	2.16529	2.1656	2.1657
25	3.3606	3.3630	3.3588	3.3595
50	0.8054	0.8092	0.8030	0.8059
75	0.3107	0.3067	0.3115	0.3103
100	0.2171	0.2170	0.2182	0.2174
Coefficiente de correlación	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999
Pendiente de la recta	0.0207	0.0209	0.0208	0.0208
Ordenada al origen	1.1851	1.8699	1.165	1.6536

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

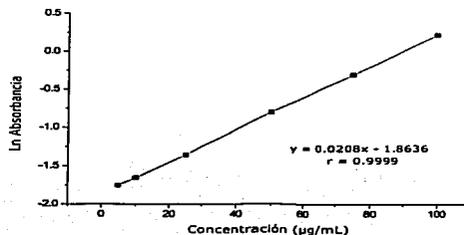


Figura 13. Linealidad del método para la cuantificación de proteínas microsomiales.

Al graficar el promedio de los logaritmos de absorbancia respecto a la concentración, el método se comportó de manera lineal en el intervalo de concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, presentando un coeficiente de correlación mayor a 0.99

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



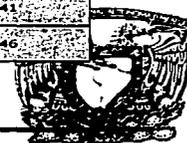
5.1.2 PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO

5.1.2.1 REPETIBILIDAD Y EXACTITUD INTRADIA DEL METODO.

Los resultados que se obtuvieron para la prueba de repetibilidad y exactitud intradía del método, se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Repetibilidad y exactitud intradía del método para la cuantificación de microsomas.

Replica	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)
1	7.5390	41.9041	78.8780
2	7.8607	39.2896	79.9822
3	8.1866	38.8482	80.5241
4	9.2401	42.2597	82.3556
5	8.4374	41.1741	80.1074
Promedio	8.2528	40.6951	80.3695
Desviación estándar	0.5790	1.3803	1.1324
Porcentaje de coeficiente de variación	7.02	3.39	1.41
Porcentaje de desviación absoluta	3.16	1.74	0.46



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos, muestran que el porcentaje del coeficiente de variación es menor de 7.02 %, mientras que el porcentaje de desviación absoluta con respecto al valor nominal no excede el 3.16 %, en sus tres niveles de concentración. Para ambos valores numéricos no hay más del 15 % de desviación, por lo que el método es repetible y exacto.



5.1.2.2 REPRODUCIBILIDAD Y EXACTITUD INTERDIA DEL METODO.

Los resultados para esta prueba se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Reproducibilidad y exactitud interdia del método para la cuantificación de microsomas.

Fecha	Replica	Concentración (µg/ml)		
11/01/82	1	75390	119041	788780
11/01/82	2	178607	3392896	799822
11/01/82	3	77750	456239	692234
11/01/82	4	6548	18556	33102
11/01/82	5	93275	62467	82258
11/01/82	6	3589	3757	65258
Promedio		80860	404786	833299
Desviación estándar		10636	19932	38957
Porcentaje del coeficiente de variación		13.15	4.86	4.67
Porcentaje de la desviación absoluta		1.07	1.20	4.16



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

En los resultados obtenidos se observa que el porcentaje del coeficiente de variación va de 4.67 a 13.15 %, mientras que la desviación absoluta con respecto al valor nominal va de 1.07 a 4.16 %. Debido a que ningún valor excede el 15 % de desviación se considera que el método es preciso y exacto.



**5.2 CUANTIFICACION DE PROTEINAS MICROSOMALES EN
TEJIDO HEPATICO, RENAL Y CEREBRAL.**

Los resultados de la cuantificación de las proteínas microsomales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Concentración microsomal final para cada tejido.

Tejido renal	0.3170	34.9623	20	689.6399
Tejido hepático	0.3170	44.1167	50	1208.2698
Tejido cerebral	0.3170	35.5723	20	718.4399



5.3 OPTIMIZACION DEL METODO PARA CUANTIFICAR DEXTRORFAN MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

Las condiciones cromatográficas finales se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones cromatográficas finales.

Fluorescencia	Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 3.5: Acetonitrilo 60:20 v/v
Flujo	1 ml/min
Columna	Columna cromatográfica Waters XTerra RP 18, con tamaño de partícula de 5 µm de diámetro, y de 4.6 x 150 mm de diámetro interno y largo.
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Detección	Fluorescencia
Excitación	Excitación 280 nm
Emitencia	Emisión 310 nm
Tiempo de ejecución	13 minutos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



5.4 VALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICAR DEXTRORFAN MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

Durante la validación, adicionalmente se incluyó a dextrometorfán, con el fin de contar con un metodo validado para el fármaco y el metabolito. En la figura 14 se observa un cromatograma de dextrorfán y dextrometorfán con tiempos de retención 5.257 y 11.436 respectivamente.

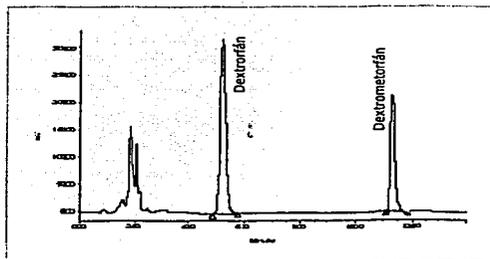


Figura 14. Cromatograma de dextrorfán y dextrometorfán.



5.4.1 LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA

Los resultados para linealidad y precisión del sistema se muestran a continuación (figura 15, tabla 10 y 11).

Tabla 10. Linealidad del sistema para dextrorfán

Concentración (µg/ml)	Área (m.u)	Concentración (µg/ml)
0.0125	5807.2	5276.5
0.025	10573.1	9840
0.1	38611.1	37025.5
0.5	178033.5	163929
1.5	189905.5	182344.1
10	379006.4	3661050.5
25	9462519	19125279
Coefficiente de correlación (r)	0.9999	0.9999
Pendiente de la recta (m)	379252.31	366090.49
Ordenada al origen (b)	910.43	990.21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla 11. Precisión del sistema para dextrorfán

0.0125	5807	5276.5	464560.00	422120.00
0.025	10573	99840	422920.00	393600.00
0.1	38611	37025.5	3386110.00	370255.00
1	378033.5	363929	378033.50	363929.00
5	1899051	1823441	379810.20	364688.20
10	3790084	3661050.5	379008.40	3661050.5
25	8482519	8125279	379300.76	365011.16
Promedio global				
Desviación estándar global				29151.64
Porcentaje del coeficiente de variación global				7.508
Porcentaje del error relativo	0.82	0.651		
Porcentaje del coeficiente de variación curva 1 y 2	1.12			

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



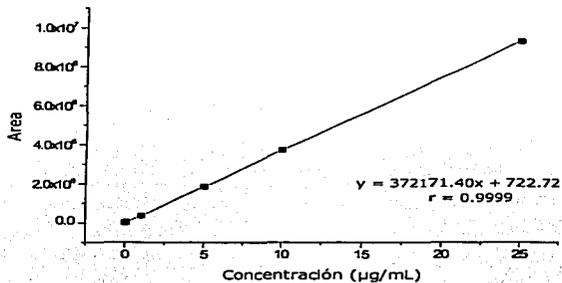


Figura 15. Linealidad del sistema para dextrorfán.

El error relativo debido a la regresión fue menor al 2 % en ambos casos y el porcentaje del coeficiente de variación del factor de respuesta fue de 1.12 %. El sistema es lineal y preciso en el rango de concentraciones de 0.0125 a 25 µg/mL.



5.4.2 LINEALIDAD DEL METODO.

En la tabla 12 se presentan los resultados obtenidos de tres curvas de calibración en el preparado de tejido conteniendo dextrorfán 0.0125 a 25 µg/mL, mostrándose también las curvas obtenidas (figura 16).

Tabla 12. Linealidad del método para dextrorfán.

0.0125	124365.52	14289.5	4964	4539.67	369.2422	15.14
0.025	18945	18900	179520	19121.67	365.70	1.79
0.1	35917.4	38090	36694	36900.83	1101.1056	1.98
1	362249	372630	362975	365949.33	5797.19	1.58
5	1824587	1851197	1811126	1832303.33	11643.658	1.30
10	3442684	3702855	3564503	3613757.33	24000.283	1.29
25	9115561	9262592	9110547	9162900.00	186372.208	1.54
Coefficiente de correlación	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		
Pendiente de la recta	364624.36	370464.24	364431.79	365506.80		
Ordenada al origen	776.14	82.99	135.65	276.27		



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

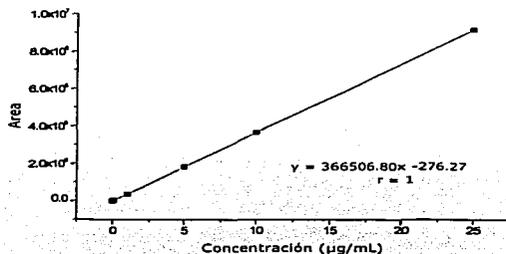


Figura 16. Linealidad del método para dextrorfán

Al graficar el promedio de las áreas respecto a la concentración, el método se comportó de manera lineal en el intervalo de concentraciones de 0.0125 a 25 µg/mL para dextrorfán, presentando un coeficiente de correlación de 0.9999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



5.4.3 PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO.

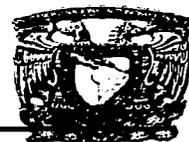
5.4.3.1 REPETIBILIDAD.

Los resultados para esta prueba se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Repetibilidad para dextrorrán.

Replicación	Concentración (µg/ml)		
1	0.5985	7.6902	20.3690
2	0.5326	7.2740	20.8435
3	0.5680	7.6990	20.9029
4	0.5543	7.5282	18.0297
5	0.5039	6.9720	20.6285
Media	0.5515	7.4323	19.9687
Desviación estándar	0.0320	0.2729	1.0220
Porcentaje de coeficiente de variación	5.80	3.67	5.12
Porcentaje de desviación absoluta	10.29	0.90	0.16

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos muestran que el por ciento del coeficiente de variación va de 3.67 a 5.80 %, mientras que el por ciento de desviación absoluta varia de 0.16 a 10.29 %. El por ciento del coeficiente de variación fue menor al límite máximo del ± 15 .

5.4.3.2 REPRODUCIBILIDAD.

Los resultados para esta prueba se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Reproducibilidad del método para dextrorfán.

Día	Replica	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)		
1	1	0.5985	7.6900	20.3690
	2	0.5326	7.2540	20.8435
2	1	0.5248	7.8025	18.5922
	2	0.4620	7.8029	17.2596
3	1	0.4829	7.5922	24.2597
	2	0.4920	7.3150	25.0831
Promedio		0.5155	7.5761	21.0679
Desviación estándar		0.0485	0.2399	3.0816
Porcentaje del coeficiente de variación		9.40	3.17	14.63
Porcentaje de la desviación absoluta		3.05	1.01	5.34



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

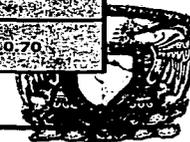
En los resultados obtenidos se observa que el porcentaje del coeficiente de variación va de 3.17 a 14.63 % para dextrorfan, mientras que el porcentaje de desviación absoluta de 1.01 a 5.34 %. Por lo tanto el método analítico es preciso y exacto.

5.4.4 LIMITE DE CUANTIFICACION Y DETECCION.

Los resultados de límite de cuantificación se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Limite de cuantificación y detección para dextrorfan.

Replica	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)
1	0.2358	0.0126	0.0046
2	0.22912	0.0112	0.0052
3	0.2518	0.0169	0.0075
4	0.2339	0.0179	0.0075
5	0.2364	0.0140	0.0060
Promedio	0.2374	0.0145	0.0062
Desviación estándar	0.0085	0.0028	0.0013
Porcentaje del coeficiente de variación	3.60	19.50	20.18
Porcentaje de desviación absoluta	5.04	16.16	0.70



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Se considero 0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como la cantidad mínima cuantificable presentando una desviación absoluta con respecto al valor nominal y un porcentaje del coeficiente de variación menor al 20 %.

El límite de detección correspondió a la concentración de 0.00625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta concentración es posible detectarla, pero no cuantificarla.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.4.5 RECOBRO O RECUPERACION ABSOLUTA.

En las tabla 16, se muestran los resultados para recuperación absoluta.

Tabla 16. Recuperación absoluta para dextrorfan.

Concentración	Replicado 1	Replicado 2	Promedio	Desviación Estándar
10.5	395310	438910		
	385432	442890		
	378901	458202		
Promedio	386547.67	446687.33	416.54	0.02
7.5	2648316	3012768		
	2754026	3289277		
	2660987	3298922		
Promedio	2687776.33	3097022.33	66.79	0.0038
20	7341729	8527816		
	7294177	8690420		
	7389200	8509283		
Promedio	7341702.00	8575839.67	85.61	0.01
		Promedio	12.5	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos el recobro para dextrorfán es de 86.31 %.

5.4.6 ESTABILIDAD DE MUESTRA PROCESADA.

En la tabla 17, se muestran los resultados para esta prueba.

Tabla 17. Estabilidad de muestra procesada para dextrorfán.

Tiempo	Dosis	Concentración		
		0.5	7.5	20
0 horas	1	0.5985	7.6900	20.3690
	2	0.5326	7.2540	20.8435
	Promedio	0.5656	7.4720	20.6063
15 horas	1	0.5586	7.5912	20.3951
	2	0.4926	7.4890	19.5893
	Promedio	0.5315	7.54	19.99
	Porcentaje de desviación absoluta	7.06	0.91	3.98

De acuerdo a los resultados obtenidos, las muestras procesadas son estables durante 15 horas.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a lo todo lo anterior, se concluye que el método validado es el adecuado para cumplir los objetivos planteados.



5.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL CYP2D1 EN TEJIDO RENAL, HEPATICO Y CEREBRAL DE RATA.

Una vez validado el método analítico para la cuantificación de dextrorfán en tejido renal, hepático y cerebral de rata Wistar, se procedió a llevar el análisis de cada tejido; la preparación de cada perfil enzimático se muestra en el apéndice 2.

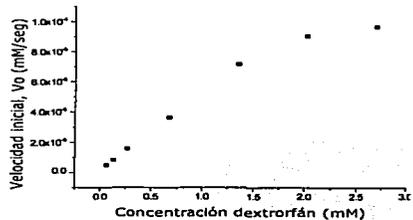
Una vez que se obtuvieron los respectivos resultados de concentración de dextrorfán en cada una de las muestras, se procedió a llevar a cabo el tratamiento matemático de estos, con la finalidad de obtener las constantes K_m , V_{max} y la relación V_{max}/K_m . Los resultados que se obtuvieron de dextrorfán se muestran en el apéndice 3.

Las respectivas graficas de Michaelis-Menten se presentan a continuación (figura 17).

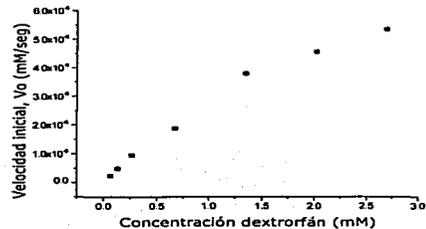


RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

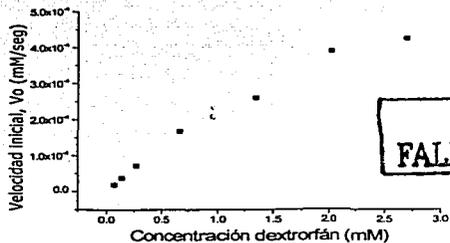
a) Tejido renal.



b) Tejido hepático

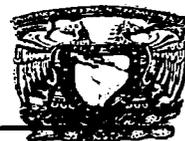


c) Tejido cerebral.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

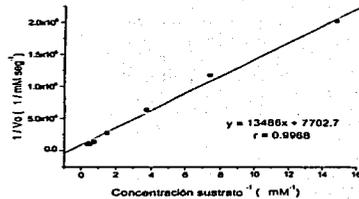
Figura 17. Graficas de Michaelis-Menten.



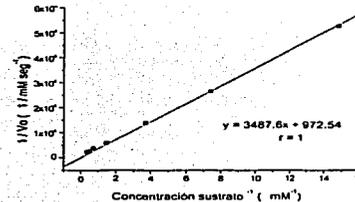
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

A partir de la grafica de Michaelis-Menten se obtuvieron las graficas de Lineweaver-Burk o doble reciproca (figura 18), y Eadie Hofstee (figura 19).

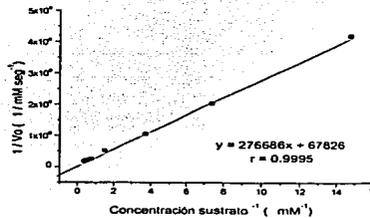
a) Tejido renal.



b) Tejido hepático.



c) Tejido cerebral.



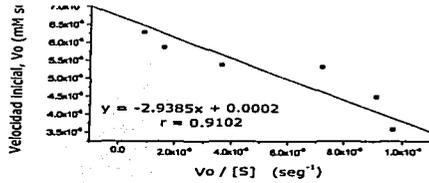
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18. Graficas de Lineweaver-Burk.

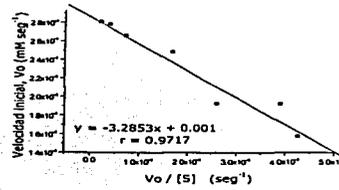


RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

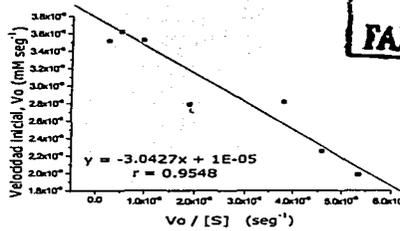
a) Tejido renal.



b) Tejido hepático.



c) Tejido cerebral.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Grafica de Eadie-Hofstee.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Finalmente las constantes enzimáticas encontradas para cada tejido se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Comparativo de constantes enzimáticas.

Tejido	Método	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
Renal	Lineweaver-Burk	1.3	1.75	7.43
	Eadie-Hofstee	2.0	2.94	6.80
Hepático	Lineweaver-Burk	10	3.59	27.9
	Eadie-Hofstee	9	3.28	27.4
Cerebral	Lineweaver-Burk	0.15	4.07	0.37
	Eadie-Hofstee	0.11	3.04	0.36

De acuerdo a los valores encontrados para las constantes enzimáticas, se observa que la relación V_{max}/K_m es un parámetro más confiable para emitir una conclusión sobre la actividad enzimática.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

El CYP2D1 hepático es el que presenta la velocidad máxima (V_{max}) superior; mientras que el CYP2D1 cerebral tiene la V_{max} menor.

Cuando la respectiva velocidad máxima de la reacción enzimática (V_{max}) se encuentra a la mitad de su valor, los CYP2D1 hepático y cerebral han catalizado en promedio 3.5 mM de dextrometorfán, en comparación con el CYP2D1 renal que es mas bajo.

Los valores de la relación de V_{max} y K_m , son contundentes. Se observa una mayor afinidad del CYP2D1 hepático hacia dextrometorfán, 3 y 75 veces mayor que el CYP2D1 renal y cerebral, respectivamente.

La afinidad del CYP2D1 hacia el dextrometorfán, se ve reflejada en el valor del factor de actividad. Se sabe que este parámetro es directamente proporcional a la tasa de metabolismo. Por lo que, en los tres tejidos estudiados, hay diferentes tasas metabólicas mediadas por CYP2D1, debido a procesos endógenos. Como es sabido en el hígado se llevan a cabo la mayor parte de las reacciones metabólicas; pero al hacer una comparación del tejido renal y cerebral se observa una mayor actividad en el primero, lo cual puede estar relacionada con la depuración que lleva a cabo este órgano, así como el metabolismo endógeno y presencia de nefrotóxicas.

Las diferencias en la actividad de diferentes CYP2D1 estudiados pueden deberse a diferencias estructurales en la proteína, ya que la



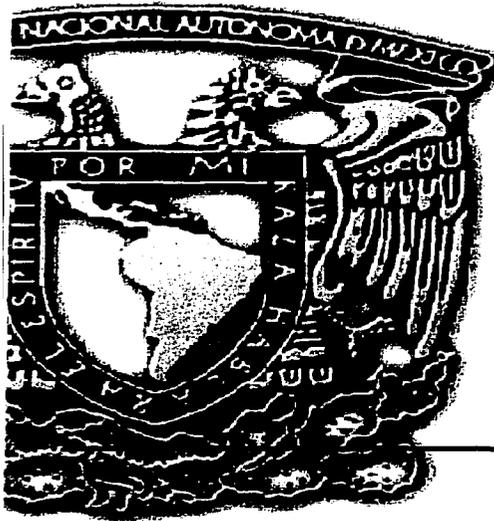
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

presencia de isoformas de CYP2D1, las cuales pudieran tener diferentes sitios catalíticos causados por alelos diferentes, en el mRNA correspondiente. Otra posibilidad es una cantidad mayor de CYP2D1 en los microsomas hepáticos mas que la calidad de la enzima.



Capítulo 6.

CONCLUSIONES .



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 6.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis, fueron:

- ❖ El tejido hepático muestra una mayor actividad enzimática para CYP2D1. le sigue el renal y finalmente el cerebral.

Conclusiones secundarias.

- ❖ En la validación del método analítico para la determinación de microsomas, se encontró que este método es:
 - Lineal en un intervalo de concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$.
 - Preciso (repetible y reproducible), tanto en un mismo día como en varios, cuando el análisis es realizado por un mismo analista, dentro del mismo laboratorio y usando los mismos equipos.
 - Exacto, en el intervalo de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$.
- ❖ El método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dexrtrorfán, empleando un sistema cromatográfico de



CONCLUSIONES

de alta resolución, fue optimizado, validado (de acuerdo a los parámetros de la NOM 177-SSA-1-1998), y aplicado a la cuantificación de estas moléculas en diferentes tejidos procedentes de rata de la cepa Wistar (tejido renal, hepático y cerebral).

❖ La validación del método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dexrorfán, arrojó las siguientes conclusiones.

El método es:

- o Lineal, dentro de un intervalo de concentraciones de 0.0125 a 25 µg/mL, para dextrometorfán, como para dexrorfán.
- o Preciso (reproducible y repetible), en uno o varios días, con el mismo analista, en el mismo laboratorio y usando el mismo equipo, para dextrometorfán y dexrorfán.
- o Exacto, en un intervalo de concentraciones de 0.0125 a 25 µg/mL, para dextrometorfán y dexrorfán.
- o Estable. La muestra procesada, de dextrometorfán y de dexrorfán es estable durante 15 horas.



CONCLUSIONES

Sugerencia:

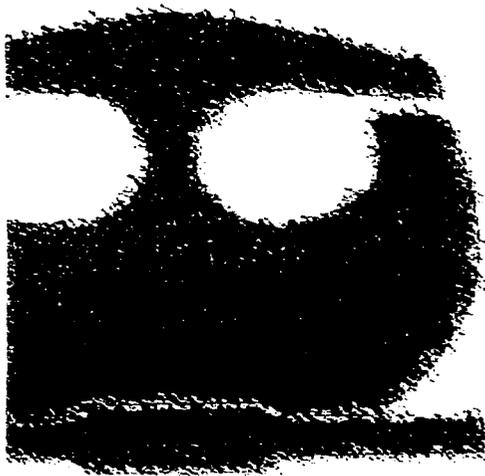
- ❖ Para conocer la causa de las diferencias en la actividad del CYP2D1, es recomendable realizar el perfil enzimático, con la presencia de inhibidores competitivos; con esto se conocería si hay presencia de isoenzimas, basándose en el hecho de que la constante de Michaelis-Menten cambiaría su valor (K_m).



Capítulo 7.

BIBLIOGRAFIA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Capítulo 8.

BIBLIOGRAFIA

1. Hardman JG, et al. **Godman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica**; Vol. I; Mc. Graw-Hill Interamericana, 9a. ed, México (1996). pp.589-590.
2. Consejo de Salubridad General. **Prontuario de Medicamentos Genéricos Intercambiables**; Consejo de Salubridad General, 1a ed, México (1999). pp 116.
3. Moffat A. C, et al. **Clarke´s Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body fluids, and Post-mortem Material**; The Pharmaceutical Press, Second ed, Great Britain (1986). pp. 520-521.
4. F. Mc. Van Barbara. **Índice de Medicamentos**. Manual Moderno. 1ª. ed. (1995) pp. 592-593.
5. Ramamoorthy Y, et al. **Cytochrome P 450.1 and cytochrome P450 2D6.10 differ in catalytic activity for multiple sustrates**. Pharmacogenetics. 11 (2001) pp. 477-487.



6. Bendriss E-K, et al. **High-performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of dextromethorphan and its main metabolites in urine and in microsomal preparations.** Journal of Chromatography B. 754 (2001) pp. 209-215.
7. Dayer P, et al. **Dextromethorphan O-demethylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P-450 db1 activity.** Clin Pharmacol Ther. 45 (1989) pp. 34-40.
8. Tyndale R.F, et al. **Characterization of cytochrome P-450 2D1 activity in rat brain: High affinity kinetics for dextromethorphan.** Drug metabolism and disposition. 27 (1999) pp. 924-930.
9. Zuber R, et al. **Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism.** Journal of cellular molecular medical 6-2 (2002) pp 189-198).
10. Murray R. K. et al. **Bioquímica de Harper.** Editorial El Manual Moderno SA de CV. Treceava edición. México (1994). pp 88-92.



BIBLIOGRAFIA

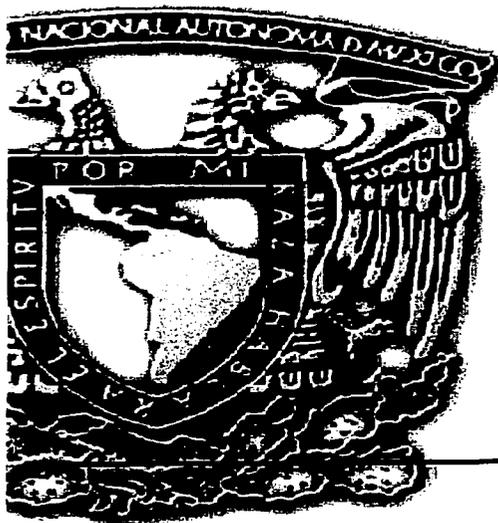
11. Avers C.J. **Biología Celular**. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. 2da edición. México, (1991), pp 70.
12. De Robertis E. M, et al **Biología Celular y Molecular**. Ed El Ateneo, 12 ava edición. Argentina (1996), pp 39.
13. Lehninger A. L, et al. **Principios de Bioquímica**. Ediciones Omega, 2da edición. España (1993), pp 198-199, 212-221.
14. Voet D, et al. **Bioquímica**. Ediciones Omega S.A. España, (1990) pp 362.
15. Francisco M. Cánovas. Laboratorio de bioquímica y biología molecular, Facultad de Ciencias e Instituto Andaluz de Biotecnología, Universidad de Malaga, 29071 Málaga, España .
www.biochem.uwo.ca/undergrad/381a/ta/lb.pdf
16. Chang R. **Physical Chemistry with Applications to Biological systems**. Macmillan Publishing Co Inc. U.S.A. (1977), pp 402.
17. Secretaría de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998**. Diario Oficial de la Federación. Primera Sección. México D. F. Viernes 7 de mayo de 1999.



- 18.** Bradford M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).



APENDICES .



APENDICES

Apéndice 1.

Resultados de la validación para dextrometorfán.

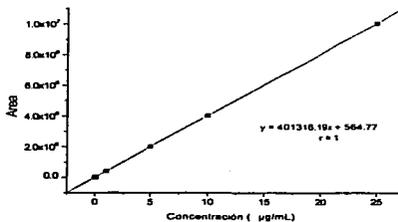
- Linealidad del sistema para dextrometorfán.

0.0125	5021.00	5025.00	401680.00	402000.00
0.025	10025.00	10039.50	401000.00	401580.00
0.1	40056.00	40192.00	400560.00	401920.00
1	400254.00	400813.50	400254.00	400813.50
5	2000544.20	2015711.00	40010814	403142.20
10	4001215.00	4025124.50	400121.50	402512.45
25	10009548.00	10056000.00	400381.00	402240.00
Promedio			400586.61	402029.74
Coefficiente de correlación (r)	1.0000	1.0000		
Pendiente (b)				
Ordenada al origen (b)				
Desviación estándar			529.719583	677.0965961
Porcentaje del error relativo	0.0076	0.0076		
Coeficiente de variación curva	0.8			



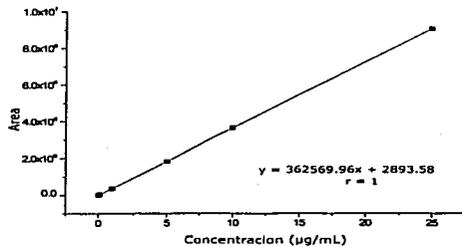
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

APENDICES



- Linealidad del método para dextrometorfán

0.025	0.000	0.000	0.000	2558.723	297.591	110.91
0.025	0.000	0.000	0.000	2491.572	454.572	5.82
0.1	0.000	0.000	0.000	3249.502	35267.172	25.4
0.1	0.000	0.000	0.000	351274.502	168916.472	25.94
0.5	181256.00	1811667.00	1815117.00	1812413.33	1630.70	0.09
1.0	362516.50	359754.00	3701225.00	3643418.50	55093.11	1.51
2.5	906230.00	9066010.00	9051454.50	9061564.83	9777.03	0.10
Coefficiente de correlación	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
Pendientes de la recta			367892.08	367892.08		
Ordenes al origen	0.07	0.16	0.38	2893.58		



- Repetibilidad para dextrometorfán.

Concentración: 500 µg/mL			
Repeticiones	Area	Concentración	Concentración
1	0.5358	1.68	1.68
2	0.5362	1.685	1.685
3	0.5369	1.69	1.69
4	0.5856	1.622	1.622
5	0.0199	1.095	1.095
6	0.193	2.556	2.556
7	0.028	0.167	0.167
8	0.028	0.167	0.167
9	0.028	0.167	0.167
10	0.028	0.167	0.167
11	0.028	0.167	0.167
12	0.028	0.167	0.167
13	0.028	0.167	0.167
14	0.028	0.167	0.167
15	0.028	0.167	0.167
16	0.028	0.167	0.167
17	0.028	0.167	0.167
18	0.028	0.167	0.167
19	0.028	0.167	0.167
20	0.028	0.167	0.167
21	0.028	0.167	0.167
22	0.028	0.167	0.167
23	0.028	0.167	0.167
24	0.028	0.167	0.167
25	0.028	0.167	0.167
26	0.028	0.167	0.167
27	0.028	0.167	0.167
28	0.028	0.167	0.167
29	0.028	0.167	0.167
30	0.028	0.167	0.167



- Reproducibilidad del método para dextrometorfán.

Replica	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)
1	0.5658	7.4689	20.3576
2	0.5562	7.6985	21.6910
1	0.5029	7.5922	19.9530
2	0.4980	7.4521	19.9889
1	0.5688	7.9830	20.3892
2	0.5481	7.5489	20.0193
Promedio	0.5400	7.6239	20.4015
Desviación estándar	0.0315	0.1973	0.6594
Porcentaje del coeficiente de variación	5.84	2.59	3.23
Porcentaje de la desviación absoluta	7.99	1.65	2.01

- Limite de cuantificación para dextrometorfán

Replica	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/mL)
1	0.23657	0.0129
2	0.2657	0.0139
1	0.2492	0.0119
2	0.2735	0.0159
1	0.2489	0.0161
2	0.2548	0.0141
Promedio	0.2548	0.0141
Desviación estándar	0.0147	0.0018
Porcentaje del coeficiente de variación		1.09
Porcentaje de la desviación absoluta	1.90	13.12



- Recuperación absoluta para dextrometorfán.

	1	2	3	4	5	6	7
Oxígeno	241761	227649	230872	229827	229651	227659	227659
Promedio	241761	227649	230872	229827	229651	227659	227659
Oxígeno	312671	325197	354982	429617	436720	432881	429617
Promedio	312671	325197	354982	429617	436720	432881	429617
Oxígeno	112593	111621	115921	109847	106278	106278	106278
Promedio	112593	111621	115921	109847	106278	106278	106278

- Estabilidad de muestra procesada para dextrometorfán.

	1	2	3	4	5	6	7
Oxígeno	202558	202215	202215	202215	202215	202215	202215
Promedio	202558	202215	202215	202215	202215	202215	202215
Oxígeno	202558	202215	202215	202215	202215	202215	202215
Promedio	202558	202215	202215	202215	202215	202215	202215



Apéndice 2.

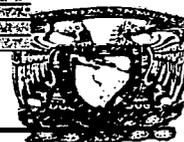
Preparación de las muestras en la determinación de la actividad enzimática del CYP2D1 en tejido renal hepático y cerebral de rata.

- Muestras tejido renal.

100	102	20	73	50	10
750	97	20	73	10	10
100	87	20	73	20	10
250	57	20	73	50	10
500	37	20	73	100	10
750	92	20	73	0	15
1000	87	20	73	0	20

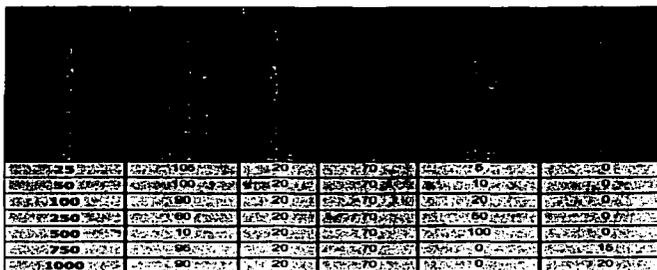
- Muestras tejido hepático.

100	162	20	23	50	0
750	147	20	23	50	0
100	137	20	23	50	0
250	107	20	23	50	0
500	87	20	23	100	0
750	142	20	23	0	15
1000	137	20	23	0	20



APENDICES

- Muestras tejido cerebral.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



APENDICES

Apéndice 3.

Resultados de concentración en la cuantificación de dextrorfan mediante CLAR.

- Tejido renal.

Concentración Sustrato Tiempo (seg)	0.0675	0.1350	0.2701	0.5751	1.3503	2.0254	2.7005
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
150	0.0006	0.0011	0.0024	0.0073	0.0114	0.0127	0.0161
300	0.0013	0.0021	0.0045	0.0114	0.0247	0.0272	0.0290
450	0.0026	0.0050	0.0088	0.0233	0.0429	0.0514	0.0295
600	0.0047	0.0079	0.0140	0.0356	0.0513	0.0578	0.0344
1200	0.0058	0.0092	0.0177	0.0429	0.0651	0.0596	0.0400
1800	0.0088	0.0154	0.0290	0.0485	0.0662	0.0647	0.0504

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



APENDICES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Tejido hepático.

Concentración Sustancia Tiempo (min) (ppm)	0.0675	0.1350	0.2701	0.4781	1.3503	2.7005	2.7005
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
150	0.0034	0.0067	0.0136	0.0271	0.0812	0.1624	0.3053
300	0.0075	0.0091	0.0177	0.0524	0.1581	0.3114	0.1277
600	0.0144	0.0198	0.0463	0.1055	0.4540	0.9124	0.1905
900	0.0180	0.0352	0.0663	0.1623	0.2122	0.462	0.1916
1200	0.0237	0.0383	0.0805	0.1996	0.2494	0.5317	0.1903
1800	0.0349	0.0696	0.1320	0.2203	0.3020	0.2790	0.2394

- Tejido cerebral.

Concentración Sustancia Tiempo (min) (ppm)	0.0675	0.1350	0.2701	0.4781	1.3503	2.7005	2.7005
0							0
150	1.56E-05	2.75E-05	4.48E-05	7.97E-05	2.33E-04	4.66E-04	1.08E-03
300	7.07E-05	1.43E-04	2.77E-04	4.77E-04	1.170E-03	2.34E-03	2.08E-03
600	1.37E-04	3.00E-04	5.74E-04	9.71E-04	2.35E-03	4.70E-03	3.25E-03
900	2.18E-04	4.24E-04	8.32E-04	1.47E-03	3.58E-03	7.16E-03	1.64E-03
1200	2.99E-04	5.64E-04	1.11E-03	1.97E-03	4.76E-03	9.52E-03	3.21E-03
1800	4.21E-04	8.87E-04	1.72E-03	2.97E-03	6.90E-03	1.38E-02	7.01E-03

