

## Influència d'alguns anestèsics i analgèsics en l'activitat citocrom P450 hepàtica (CYP450) de rata

María del Carmen Gómez Martín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA**

**INFLUÈNCIA D'ALGUNS ANESTÈSICS I ANALGÈSICS EN  
L'ACTIVITAT CITOCROM P450 HEPÀTICA (CYP450)  
DE RATA.**

María del Carmen Gómez Martín



*Agraïments per totes les persones que m'han ajudat en aquest treball.*

*Agraïments als dos Directors de la Tesi,  
el Dr. Josep Solà i Vidal i la Dra. Concepció Peraire i Guitart,  
per la seva feina i el seu temps dedicat a aquest projecte.*



*Als meus pares,*



<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Metabolisme de Xenobiòtics</b> .....	<b>21</b>
1.1.1	<i>El CYP450</i> .....	21
1.1.1.1	<i>Nomenclatura</i> .....	24
1.1.1.2	<i>Distribució en Teixits de Rata</i> .....	25
1.1.2	<i>Matriu : Microsomes Hepàtics de Rata (RLM)</i> .....	26
1.1.3	<i>Substractes i Inhibidors Específics</i> .....	27
1.1.3.1	<i>Substractes Específics</i> .....	27
1.1.3.2	<i>Inhibidors Específics</i> .....	28
<b>1.2</b>	<b>Anestèsics i Analgèsics</b> .....	<b>28</b>
1.2.1	<i>Ketoprofè, KT</i> .....	29
1.2.2	<i>Ketamina, KTA</i> .....	30
1.2.3	<i>Buprenorfina, BN</i> .....	31
1.2.4	<i>Fentanil, FEN</i> .....	32
1.2.5	<i>Xilacina, XYL</i> .....	33
<b>1.3</b>	<b>Interaccions Farmacològiques en el Metabolisme del Complex CYP450 Hepàtic</b> .....	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>OBJECTIU</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>PLA DE TREBALL</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Material i Equips Generals</b> .....	<b>43</b>
4.1.1	<i>Anestèsics</i> .....	43
4.1.2	<i>Analgèsics</i> .....	43
4.1.3	<i>Matrius</i> .....	43
4.1.4	<i>Reactius</i> .....	44
4.1.5	<i>Solvents i Productes per Solucions Reguladores del pH</i> .....	44
4.1.6	<i>Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC)</i> .....	45
4.1.7	<i>Equips Varis</i> .....	45
<b>4.2</b>	<b>Material per l'Extracció de Fetge i l'Obtenció de RLM</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Animals</b> .....	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Caracterització Funcional dels Lots de RLM</b> .....	<b>46</b>
4.4.1	<i>Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	46
4.4.2	<i>Determinació del Citocrom P450 en RLM</i> .....	46
4.4.3	<i>Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM</i> .....	47
<b>4.5</b>	<b>Cinètiques Enzimàtiques</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6</b>	<b>Estudi d'Inhibició <i>In Vitro</i> de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN</b> .....	<b>47</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinació de la Unió <i>In Vitro</i> de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model <i>In Vitro</i></b> .....	<b>47</b>
<b>4.8</b>	<b>Programes Informàtics</b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>MÈTODES</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Procediment per l'Extracció de Fetge de Rata i l'Obtenció de RLM</b> .....	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterització Funcional dels Lots de RLM</b> .....	<b>51</b>
5.2.1	<i>Procediment per la Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	51
5.2.2	<i>Procediment per la Determinació de la Concentració de CYP450 en RLM</i> .....	51
5.2.3	<i>Procediment per la Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM</i> .....	52



5.3	L'Incubat.....	54
5.4	Cinètiques Enzimàtiques.....	55
5.4.1	<i>Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP450-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	55
5.4.2	<i>Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math></i> .....	56
5.5	Estudi <i>In Vitro</i> d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN.....	58
5.6	Preparació de les Mostres per l'Anàlisi.....	63
5.7	Anàlisi per HPLC.....	63
5.8	Determinació de la Unió de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model <i>In Vitro</i> .....	69
5.8.1	<i>Determinació de la Recuperació Analítica</i> .....	70
5.8.2	<i>Determinació del Percentatge d'Unió de la KTA al Filtre del Sistema d'Ultrafiltració</i> .....	71
6	TRACTAMENT DE LES DADES.....	73
6.1	Caracterització dels Lots de RLM.....	73
6.1.1	<i>Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	73
6.1.2	<i>Determinació del CYP450 en RLM</i> .....	73
6.1.3	<i>Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM</i> .....	74
6.2	Cinètiques Enzimàtiques.....	74
6.2.1	<i>Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP450-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	74
6.2.2	<i>Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics <math>V_{max}</math> i <math>K_m</math></i> .....	75
6.3	Estudi <i>In Vitro</i> d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN.....	77
6.3.1	<i>Determinació de la <math>K_{m,app}</math> i Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max,app}</math></i> .....	77
6.3.2	<i>Càlcul de l'<math>IC_{50}</math></i> .....	78
6.3.3	<i>Càlcul de la <math>K_i</math>. Mètode de Regressió No-Lineal Simultània, SNLR. Equacions derivades de M-M</i> .....	79
6.3.3.1	<i>Inhibició Competitiva Simple</i> .....	80
6.3.3.2	<i>Inhibició No Competitiva Simple</i> .....	81
6.3.3.3	<i>Inhibició Acompetitiva Simple</i> .....	82
6.3.3.4	<i>Inhibició Mixta</i> .....	84
6.3.4	<i>Fòrmules d'Inhibició Reversible Sigmoidal</i> .....	85
6.3.4.1	<i>Inhibició Competitiva Sigmoidal</i> .....	85
6.3.4.2	<i>Inhibició No Competitiva Sigmoidal</i> .....	86
6.3.4.3	<i>Inhibició Acompetitiva Sigmoidal</i> .....	86
6.3.5	<i>Càlcul de la <math>K_i</math>. "Mètode de <math>K_{m,app}</math>"</i> .....	87
6.3.6	<i>Càlcul de la <math>K_i</math> "IC<sub>50</sub>-to-<math>K_i</math> Converter"</i> .....	87
6.4	Determinació de la Unió No-Específica del KT, la KTA, la BN, el FEN i la XYL a Proteïnes Microsomals.....	88
6.4.1	<i>Determinació de la Unió de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model In Vitro</i> .....	88
6.4.1.1	<i>Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R)</i> .....	88
6.4.1.2	<i>Càlcul del Percentatge de KTA Unida (%M)</i> .....	88
6.4.1.3	<i>Càlcul del Percentatge del KTA Unida (%B) i No Unida (%F)</i> .....	89

6.4.2	<i>Predicció de la Unió No-Específica a les Proteïnes Microsomal Utilitzant les Propietats Físico-Químiques del KT, la KTA, el BN, el FEN i la XYL. Models In Silico</i> .....	89
6.5	<b>Càlcul de la <math>K_i</math> Modificada per la <math>f_{u,mic}</math></b> .....	91
6.6	<b>Càlcul de <math>R_{exp}</math></b> .....	92
7	<b>RESULTATS</b> .....	93
7.1	<b>Caracterització Funcional dels Lots de RLM</b> .....	93
7.1.1	<i>Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	93
7.1.2	<i>Determinació del Citocrom P450 en RLM</i> .....	93
7.1.3	<i>Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM</i> .....	94
7.2	<b>Cinètiques Enzimàtiques</b> .....	95
7.2.1	<i>Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal</i> .....	95
7.2.2	<i>Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math></i> .....	98
7.3	<b>Estudi <i>In vitro</i> d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN</b> .....	101
7.3.1	<i>Determinació de la <math>K_{m,app}</math> i Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max}</math></i> .....	125
7.3.2	<i>Càlcul de l'<math>IC_{50}</math></i> .....	130
7.3.3	<i>Càlcul de la <math>K_i</math> Mètode SNLR</i> .....	135
7.3.4	<i>Càlcul de la <math>K_i</math>, Mètode de la <math>K_{m,app}</math> i Mètode "IC<sub>50</sub>-to-Ki Converter"</i> .....	144
7.4	<b>Determinació de la Unió No-Específica del KT, la KTA, el BN, el FEN i la XYL a Proteïnes Microsomal</b> .....	145
7.4.1	<i>Determinació de la Unió No-específica de la KTA a Proteïnes Microsomal. Model In vitro</i> .....	145
7.4.1.1	<i>Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R)</i> .....	146
7.4.1.2	<i>Càlcul del Percentatge de KTA No Unida (%M) al Material d'Ultracentrifugació</i> .....	146
7.4.1.3	<i>Càlcul del Percentatge de KTA Unit (%B) i No Unit (%F)</i> .....	147
7.4.2	<i>Unió No-Específica a les Proteïnes Microsomal Utilitzant les Propietats Físico-Químiques del KT, la KTA, la BN, el FEN i la XYL. Model In silico</i> .....	147
7.5	<b>Càlcul de la <math>K_i</math> Modificada per <math>f_{u,mic}</math></b> .....	148
7.6	<b>Predicció d'Interaccions Potencials <i>In Vivo</i>. Càlcul de <math>R_{exp}</math></b> .....	150
8	<b>DISCUSIÓ</b> .....	151
9	<b>CONCLUSIONS</b> .....	163
10	<b>REFERÈNCIES</b> .....	165

## ÍNDIX DE TAULES

Taula 1	Isoformes CYP450 Hepàtiques Constitutives i No Constitutives en Rata, i la Seva Especificitat .....	26
Taula 2	Reactius: Substractes i Metabòlits Específics, Estàndards Intern i Inhibidors Específics Utilitzats en les Reaccions del CYP450. ....	44
Taula 3	Concentracions de Substrate Específic, Concentracions de Proteïna i Temps d'Incubació Utilitzats en la Determinació de la Linealitat de la Concentració de Proteïna i del Temps d'Incubació. ....	56
Taula 4	Concentracions de Substractes Específics, Concentracions de Proteïna Microsomal, i Temps d'Incubació per Determinar les Diferents Cinètiques Enzimàtiques. ....	57
Taula 5	Composició de les Mostres Control per Verificar la Metodica Analítica. ....	59
Taula 6	Composició dels Incubats pels Estudis de Cinètica Enzimàtica (Concentració de Fàrmac Zero) i Estudis d'Inhibició (en Presència de Fàrmac). CYP2E1, CYP2D1 i CYP1A1/2.....	61
Taula 7	Composició dels Incubats pels Estudis de Cinètica Enzimàtica (Concentració de Fàrmac Zero) i Estudis d'Inhibició (en Presència de Fàrmac). CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2. ....	62
Taula 8	Components de les Rectes de Calibració per les Reaccions Específiques dels CYP2E1, CYP2D1 i CYP1A1/2. ....	65
Taula 9	Components de les Rectes de Calibració per les Reaccions Específiques dels CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2. ....	65
Taula 10	Lot, Mètode de Preparació dels Microsomes, i Concentració de Proteïna Microsomal en els RLM Obtinguts.....	93
Taula 11	Lot i Contingut de CYP450 en els RLM Obtinguts .....	94
Taula 12	Valors de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en els Lots de RLM Obtinguts .....	95
Taula 13	Reaccions Específiques de cada CYP450: Temps d'Incubació i Concentració de Proteïna Microsomal.....	98
Taula 14	Paràmetres Cinètics $K_m$ i $V_{max}$ . Models de Michaelis-Menten i de Hill. CYP2E1, CYP2D1, CYP1A1/2 i CYP2B1/2 .....	99
Taula 15	Paràmetres Cinètics $K_m$ i $V_{max}$ . Models de Michaelis-Menten i de Hill. CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2 .....	100
Taula 16	Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....	102
Taula 17	Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....	103
Taula 18	Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL.....	104
Taula 19	Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat).Incubacions amb KT i amb KTA .....	105
Taula 20	Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....	106
Taula 21	Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL.....	107
Taula 22	Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....	108

<b>Taula 23</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>109</b>
<b>Taula 24</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL .....</b>	<b>110</b>
<b>Taula 25</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....</b>	<b>111</b>
<b>Taula 26</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>112</b>
<b>Taula 27</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL .....</b>	<b>113</b>
<b>Taula 28</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....</b>	<b>114</b>
<b>Taula 29</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>115</b>
<b>Taula 30</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL .....</b>	<b>116</b>
<b>Taula 31</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....</b>	<b>117</b>
<b>Taula 32</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>118</b>
<b>Taula 33</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL .....</b>	<b>119</b>
<b>Taula 34</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....</b>	<b>120</b>
<b>Taula 35</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>121</b>
<b>Taula 36</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL .....</b>	<b>122</b>
<b>Taula 37</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA .....</b>	<b>123</b>
<b>Taula 38</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN .....</b>	<b>124</b>
<b>Taula 39</b>	<b>Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL .....</b>	<b>125</b>
<b>Taula 40</b>	<b>Paràmetres Cinètics <math>K_{m,app}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{max,app}</math> (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP1A1/2 i CYP2B1/2. Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max}</math> .....</b>	<b>126</b>
<b>Taula 41</b>	<b>Paràmetres Cinètics <math>K_{m,app}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{max,app}</math> (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP2D1 i CYP3A1/2. Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max}</math> .....</b>	<b>127</b>
<b>Taula 42</b>	<b>Paràmetres Cinètics <math>K_{m,app}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{max,app}</math> (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP2C11 i CYP2C. Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max}</math> .....</b>	<b>128</b>
<b>Taula 43</b>	<b>Paràmetres Cinètics <math>K_{m,app}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{max,app}</math> (pmol/mg proteïna/min) pel CYP2A1/2. Càlcul del Quocient <math>K_{m,app}/V_{max}</math> .....</b>	<b>129</b>
<b>Taula 44</b>	<b>Estadística. Comparació dels Quocients <math>K_{m,app}/V_{max}</math> Entre les Diferents Concentracions de Fàrmac per a Totes les Isoformes CYP450 .....</b>	<b>130</b>
<b>Taula 45</b>	<b>Valor d'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP450 Susceptibles d'Interaccionar per Inhibició segons el Test Estadístic.....</b>	<b>131</b>

<b>Taula 46</b>	<b>Valors de la <math>K_i</math> i dels Paràmetres Cinètics <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math> per cada Tipus d'Inhibició. Model de M-M. KT i KTA .....</b>	<b>136</b>
<b>Taula 47</b>	<b>Valors de la <math>K_i</math> i dels Paràmetres Cinètics <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math> per cada Tipus d'Inhibició. Model del M-M. BN, FEN i XYL .....</b>	<b>137</b>
<b>Taula 48</b>	<b>Valors de la <math>K_i</math> i dels Paràmetres Cinètics <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math> per cada Tipus d'Inhibició. Model de Hill .....</b>	<b>138</b>
<b>Taula 49</b>	<b>Concentracions Terapèutiques de Fàrmac en Plasma / Sang de Rata .....</b>	<b>139</b>
<b>Taula 50</b>	<b>Valors dels Paràmetres d'Inhibició (<math>IC_{50}</math> i <math>K_i</math>) i Tipus d'Inhibició per 18 Relacions Fàrmac-Isoforma CYP450 Resultants del Test Estadístic .....</b>	<b>140</b>
<b>Taula 51</b>	<b>Valors de <math>K_i</math> Estimats pels Mètodes de: SNLR, “ <math>K_{m,app}</math> ” i “<math>IC_{50}</math>-to-<math>K_i</math> Converter” .....</b>	<b>144</b>
<b>Taula 52</b>	<b>Determinació de la <math>f_{u,mic}</math> pel Model <i>In vitro</i>. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R) .....</b>	<b>146</b>
<b>Taula 53</b>	<b>Determinació de la <math>f_{u,mic}</math> pel Model <i>In vitro</i>. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de KTA No Unida al Material d'Ultracentrifugació (%M) .....</b>	<b>146</b>
<b>Taula 54</b>	<b>Determinació de la <math>f_{u,mic}</math> pel Model <i>In vitro</i>. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de KTA No Unida als RLM (%F) .....</b>	<b>147</b>
<b>Taula 55</b>	<b>Tipus de Càrrega i Valors de <math>f_{u,mic}</math> de cada Fàrmac segons el Model de Predicció <i>In silico</i> Utilitzat .....</b>	<b>147</b>
<b>Taula 56</b>	<b>Valors de <math>f_{u,mic}</math> Determinada <i>In silico</i> per KT, BN, FEN I XYL i <i>In vitro</i> per la KTA. Càlcul de la <math>K_i</math> No Unida .....</b>	<b>149</b>
<b>Taula 57</b>	<b>Valors del Quocient <math>R_{exp}</math> per cada Fàrmac i Isoforma .....</b>	<b>150</b>
<b>Taula 58</b>	<b>Valors d'<math>IC_{50}</math> per cada Fàrmac i Isoforma CYP450 on es Detecta una Interacció Potencial per Inhibició en l'Activitat de la Isoforma .....</b>	<b>157</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1</b>	<b>Estructura Química del Grup Hemo del CYP450 .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Cicle Catalític del CYP450 .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Traspàs d'Electrons des del NADPH-CYP450 Reductasa al CYP450. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Estructura Química del Ketoprofè (KT) .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Estructura Química de la Ketamina (KTA) .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Estructura Química de la Buprenorfina (BN).....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Estructura Química del Fentanil (FEN) .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Estructura Química de la Xilacina (XYL) .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Cicle de la Reacció del <i>Biuret</i> amb el Mètode <i>Folin-Lowry</i> per la Determinació de la Concentració de la Proteïna Microsomal. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Cicle del Funcionament de la NADPH-CYP450 Reductasa.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Cinètiques Enzimàtiques: Reaccions Específiques. Substractes i Metabòlits Específics.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Cinètiques Enzimàtiques: Reaccions Específiques. Substractes i Metabòlits Específics. (Continuació).....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Disseny Experimental per l'Estudi d'Inhibició (n=3).....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Cromatograma Representatiu de la Determinació de la 6-hidroxiclorzoxazona.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Cromatograma Representatiu de la Determinació del Dextrorfà. ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Cromatograma Representatiu de la Determinació de la Resorufina. ....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Cromatograma Representatiu de la Determinació de les Hidroxitestosterones. ....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomals <i>In Vitro</i>. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomals <i>In Vitro</i>: Determinació de la Recuperació Analítica de la KTA. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomals <i>In Vitro</i>: Determinació de la Unió de la KTA al Filtre. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Representació Gràfica de l'Equació de Michaelis-Menten (M-M). Obtenció dels Paràmetres <math>K_m</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{\max}</math> (pmol/mg proteïna/min) .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Representació Gràfica de l'Equació de Hill. Obtenció dels Paràmetres <math>K_m</math> (<math>\mu\text{M}</math>) i <math>V_{\max}</math> (pmol/mg proteïna/min) .....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Representació Teòrica de l'Ajustament de M-M a les Activitats Enzimàtiques per una Reacció Específica (Una Isoforma CYP450) en l'Experiment d'Inhibició d'un Fàrmac.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Representació Teòrica d'un Model d'Inhibició Mitjançant Regressions No-Lineals Simultànies (SNLR) Utilitzant WinNonlin .....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Esquema Inhibició Competitiva Simple.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Esquema Inhibició No Competitiva Simple .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 27</b>	<b>Esquema Inhibició Acompetitiva Simple .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 28</b>	<b>Esquema Inhibició Mixta .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 29</b>	<b>Espectre d'Absorció del CYP450.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 30</b>	<b>Representacions de la Linealitat en la Producció de Metabòlit Específic en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal per cada CYP450.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 31</b>	<b>Representacions de la Linealitat en la Producció de Metabòlit Específic en Funció del Temps d'Incubació per cada CYP450 .....</b>	<b>97</b>

<b>Figura 32</b>	<b>Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP1A1/2, CYP2B1/2 i CYP2D1.....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 33</b>	<b>Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP3A1/2, CYP2C11 i CYP2C.....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 34</b>	<b>Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb el CYP2A1/2.....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 35</b>	<b>Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. XYL-CYP2C, XYL-CYP2C11, XYL-CYP2D1.....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 36</b>	<b>Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. XYL-CYP3A1/2 .....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 37</b>	<b>Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. KT-CYP3A1/2 .....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 38</b>	<b>Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. KTA-CYP2B1/2.....</b>	<b>143</b>
<b>Figura 39</b>	<b>Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. BN-CYP3A1/2 .....</b>	<b>143</b>

## ÍNDEX D'ANNEX

<b>Annex 1</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica Competitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors.....</b>	<b>175</b>
<b>Annex 2</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica No Competitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors .....</b>	<b>176</b>
<b>Annex 3</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica Mixta Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors.....</b>	<b>177</b>
<b>Annex 4</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica Acompetitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors.....</b>	<b>178</b>
<b>Annex 5</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica Competitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors .....</b>	<b>179</b>
<b>Annex 6</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica No Competitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors.....</b>	<b>180</b>
<b>Annex 7</b>	<b>Model d'Inhibició Enzimàtica Acompetitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors .....</b>	<b>181</b>
<b>Annex 8</b>	<b>Posters Relacionats amb el Treball i Presentats a Diferents Congressos .....</b>	<b>183</b>





**LLISTAT D'ABREVIATURES I DEFINICIONS DE TERMES**

<b>AcN</b>	Acetonitril
<b>AE</b>	Activitat enzimàtica (nmol/mg/min)
<b>AES</b>	Activitat específica (nmol/mg)
<b>AIC</b>	Criteri d' Akaike
<b>%B</b>	Percentatge de fàrmac unit (%)
<b>BN</b>	Buprenorfina
<b>β-NADP</b>	β-Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
<b>C</b>	Constitutiu
<b>C<sub>FMS</sub></b>	Concentració de ketamina trobada en les mostres FMS (pmol/ml)
<b>CIM</b>	Cimetidina
<b>CONC</b>	Concentració específica de CYP450
<b>CP</b>	Concentració de proteïna
<b>C<sub>RLMS</sub></b>	Concentració de ketamina trobada en les mostres RLMS (pmol/ml)
<b>CUM</b>	Cumarina
<b>CV%</b>	Coefficient de variació (%)
<b>CYP</b>	Citocrom
<b>CYP450</b>	Citocrom P450
<b>CZX</b>	Clorzoazona
<b>D</b>	Increment d'absorció per minut
<b>DDC</b>	Dietilditiocarbamat
<b>DEX</b>	Dextrometorfà
<b>D-G-6P</b>	Dextro-glucosa-6-fosfat
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>E</b>	Enzim
<b>EI</b>	Complexe enzim-inhibidor
<b>ERO</b>	Etoxiressorufina
<b>ES</b>	Complexe enzim-substrate
<b>ESI</b>	Complexe enzim-substrate-inhibidor
<b>%F</b>	Percentatge de fàrmac no unit (%)
<b>FAD</b>	Flavin adenina dinucleòtid
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fe</b>	Ferro

## Abreviatures

<b>FEN</b>	Fentanil
<b>FMN</b>	Flavin mononucleòtid
<b>FMS</b>	Matriu composta per microsomes ultrafiltrada
<b><math>f_{u,mic}</math></b>	Fracció no unida a proteïnes microsomals
<b>GH</b>	Hormona del creixement
<b>G-6P-DH</b>	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
<b>HRSDMC</b>	Microsomas de fetge de rata Sprague-Dawley mascle control
<b>I</b>	Inhibidor
<b><math>I_{max}</math></b>	Concentració màxima d'inhibidor
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentració d'inhibidor que disminueix l'activitat màxima d'un enzim a la meitat.
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b><math>K_i</math></b>	Constant d'inhibició ( $\text{min}^{-1}$ )
<b><math>K_i^u</math></b>	Constant d'inhibició no unida a proteïna microsomal ( $\text{min}^{-1}$ )
<b><math>K_m</math></b>	Constant de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )
<b><math>K_{m,app}</math></b>	Constant aparent de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )
<b>KT</b>	Ketoprofè
<b>KTA</b>	Ketamina
<b><math>K_s</math></b>	Constant de formació del complexe enzim-substracte o constant de Michaelis-Menten $K_m$
<b><math>K_p</math></b>	Constant de formació de producte
<b>log D</b>	Coefficient de distribució
<b>log P</b>	Coefficient de repartiment
<b>log P/D</b>	Coefficient de repartiment en molècules bàsiques i coefficient de distribució per molècules àcides.
<b>%M</b>	Percentage de fàrmac no unit al material d'ultrafiltració
<b><math>M_A</math></b>	Àrea de pic trobada de la ketamina en les mostres FMS grup A
<b><math>M_B</math></b>	Àrea de pic trobada de la ketamina en les mostres FMS grup B
<b>M-M</b>	Michaelis Menten
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat reduïda

## Abreviatures

<b>NAF</b>	$\alpha$ -Naftoflavona
<b>NSAID</b>	Antiinflamatori no esteroïdal
<b>ORF</b>	Orfenadrina
<b>P</b>	Producte
<b>P-450</b>	Pigment 450
<b>pKa</b>	Logaritme negatiu de la constant de dissociació àcida d'un àcid feble.
<b>p.o.</b>	Oral
<b>PRO</b>	Pentoxiresorufina
<b>QN</b>	Quinidina
<b>%R</b>	Percentatge de recuperació de fàrmac
<b>R<sub>exp</sub></b>	Quocient depenent de la $K_i$ i de la concentració màxima d'inhibidor assolida <i>in vivo</i>
<b>R<sub>FMS</sub></b>	Àrea de pic de ketamina trobada en les mostres FMS
<b>RLM</b>	Microsomes de fetge de rata
<b>RLMS</b>	Matriu composta per microsomes, no ultrafiltrada.
<b>R<sub>RMLS</sub></b>	Àrea de pic de ketamina trobada en les mostres RMLS
<b>S</b>	Substrate
<b>SBC</b>	Criteri de Schwarz
<b>s.c.</b>	Subcutani
<b>SNC</b>	Sistema nerviós central
<b>SLNR</b>	Regressió no-lineal simultània
<b>SD</b>	Desviació estàndard
<b>SUL</b>	Sulfafenazol
<b>TCA</b>	Tricloroacètic
<b>TF</b>	Tampó fostat sòdic
<b>Tris</b>	Tris -(hidroximetil)-aminometà
<b>TRO</b>	Troleandomicina
<b>TST</b>	Testosterona
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v</b>	Velocitat
<b>V<sub>o</sub></b>	Velocitat inicial
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocitat màxima (pmol/mg/min)
<b>XYL</b>	Xilacina



# **1 INTRODUCCIÓ**

## **1.1 Metabolisme de Xenobiòtics**

Els xenobiòtics són compostos exògens als éssers vius, i encara que no formen part de la seva bioquímica normal, s'incorporen a les seves vies metabòliques. Els xenobiòtics entren a l'organisme per diferents vies: oral (p.o.), intravenosa (i.v.) subcutània (s.c.), intramuscular (i.m.), respiratòria, etc.

Els xenobiòtics es poden classificar segons el seu origen i segons els seus efectes. Els organismes, per la seva part, han desenvolupat sistemes de detoxificació per eliminar-los.

En aquest treball, s'estudien xenobiòtics que tenen o estan desenvolupats per tenir una activitat terapèutica (fàrmacs). Aquests compostos són normalment de naturalesa lipofílica, de forma majoritària amb capacitat de difondre per les membranes cel·lulars, encara que alguns interaccionen amb transportadors específics. Un cop dins de la cèl·lula són normalment difícils d'eliminar. Per aquest motiu, els organismes transformen els xenobiòtics mitjançant processos metabòlics, i així faciliten la seva eliminació.

En aquest procés de detoxificació intervenen un conjunt d'enzims poc específics que reconeixen una àmplia gamma de compostos. Les reaccions de metabolisme d'aquests enzims s'anomenen reaccions de biotransformació de fase I, i reaccions de conjugació o de fase II.

En el present treball s'estudien les reaccions de fase I, que són processos d'oxidació, reducció i hidròlisi que es donen a temperatura fisiològica. El Citocrom P450, CYP450, és el principal complexe enzimàtic encarregat de les reaccions de fase I, i es caracteritza per la gran varietat de processos que poden catalitzar així com la quantitat de substractes diferents que poden metabolitzar.

(ref. 1, ref. 2)

### **1.1.1 El CYP450**

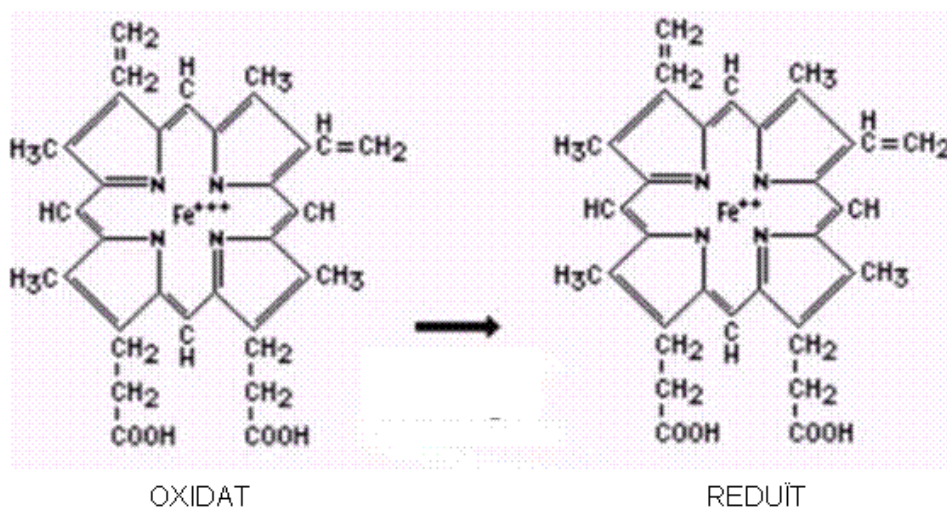
El CYP450 és una família de pigments de naturalesa hemoproteica (hemoproteïna) que es troba a gairabé tots els òrgans i principalment al fetge.

## Introducció

En general els CYP450 dels organismes eucariòtes tenen un pes molecular entre 50 – 60 kD. La similitud en la seqüència d'aminoàcids entre els diferents CYP450 és molt baixa, arribant a ser menor del 20% en molts casos. L'extrem C-terminal de la proteïna presenta una conservació de les seqüències d'aminoàcids entre els diferents CYP450 més gran que a la regió N-terminal. De forma general, la molècula de l'enzim està constituïda per una combinació de regions  $\alpha$ -hèlix i de fulles fonamentalment a la regió de la proteïna que envolta el grup hemo, mentre que les regions més variables són les que corresponen als llocs d'ancoratge a la membrana del reticle endoplasmàtic, o a les regions d'unió i reconeixement de substractes. La part ancorada és una hèlix hidrofòbica propera a l'extrem N-terminal, i per aquest motiu, la major part de la proteïna es situa a la cara citosòlica de la membrana. La regió del grup hemo es correspon amb el centre catalític de l'enzim, a on hi ha una transferència d'electrons i de protons, que reudeixen l'ió fèrric (III),  $Fe^{3+}$ , i formen l'espècie activada de l'oxígen.

A la estructura del grup hemo/centre catalític hi ha l'àtom de ferro (Fe) al centre, i està unit a quatre àtoms de nitrogen de l'anell de porfirina (veure Figura 1). El Fe té com a cinquè lligand el grup tiol d'una cisteïna, i el sisè lligand és una molècula d'aigua.

Figura 1 Estructura Química del Grup Hemo del CYP450



La Figura 2 mostra les etapes del cicle catalític del CYP450:

1. Unió del substrate (RH). A l'àtom de ferro del centre actiu de l'enzim que està en estat oxidat ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se li uneix el substrate i es forma el complexe enzim-substrate, que és relativament estable. La unió causa una baixada del potencial redox que afavoreix la transferència d'un primer electró.
2. Primera reducció. El primer electró ve transferit per l'enzim de membrana NADPH-citocrom P450 reductasa, mitjançant la reacció d'oxidació una molècula de NADPH a NADP. Veure Figura 3.
3. Unió de la molècula d'oxigen. A l'àtom  $\text{Fe}^{2+}$  se li uneix de forma covalent una molècula d'oxigen, i es forma el complexe  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-$ , que de forma lenta passa a convertir-se en un complexe més estable,  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$ .
4. Segona reducció. Un altre electró transferit pel NADPH-citocrom P450 reductasa entra en el cicle i es forma el complexe  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}$ .
5. Alliberament de la molècula d'oxigen. El  $\text{O}_2^{2-}$  reacciona amb 2 protons del medi, es trenca l'enllaç O-O i es forma una molècula d'aigua i el complexe  $(\text{FeO})^{3+}$ .
6. Formació del producte (ROH). L'àtom d'oxigen del complexe  $(\text{FeO})^{3+}$  es transfereix al substrate i l'oxida.
7. Alliberació del producte des del centre actiu, que torna al seu estat inicial.

**Figura 2** Cicle Catalític del CYP450



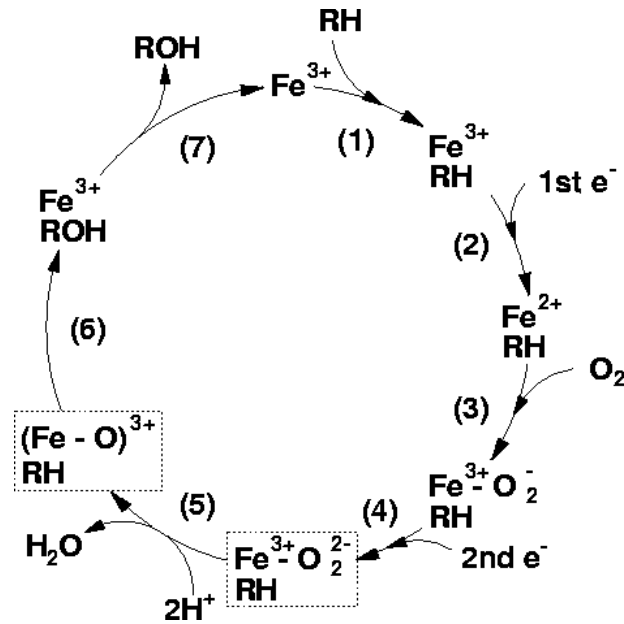
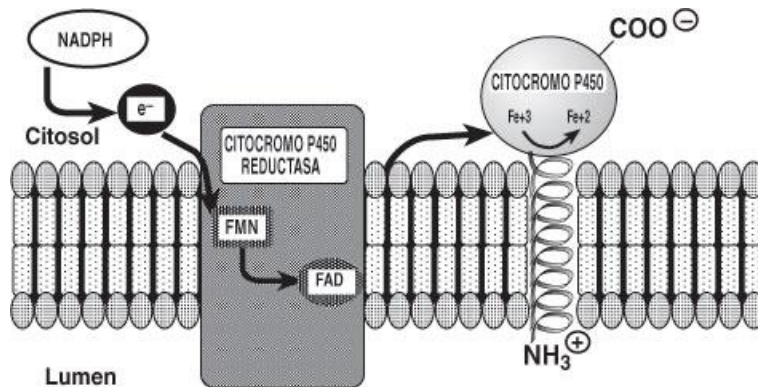


Figura 3 Traspàs d'Electrons des del NADPH-CYP450 Reductasa al CYP450.



Els P450 catalitzen reaccions d'oxidació regio- i estero-específiques a temperatura fisiològica, i la seva funció catalítica està relacionada amb el metabolisme de la majoria dels fàrmacs i d'altres xenobiòtics.

(ref. 3, ref. 4, ref. 5, ref. 6, ref. 7, ref. 8, ref. 9)

### 1.1.1.1 Nomenclatura

La superfamília dels P-450 és el conjunt d'isoformes CYP450 anomenades i classificades segons la seva seqüència d'aminoàcids en les cadenes polipeptídiques. S'anomenen amb les sigles CYP seguides d'un número que designa la família, una lletra que identifica la subfamília i un segon número que correspon al gen. Els enzims d'una mateixa família tenen una similitud igual o

major del 40% en la seqüència d'aminoàcids. Dintre d'una mateixa subfamília, han de tenir una homologia superior al 55% en la seqüència d'aminoàcids. I dintre de les subfamílies es classifiquen en subsubfamílies quan les seqüències difereixen en més d'un 3% .

Tot i així, la classificació segons l'homologia en la seqüència d'aminoàcids no té una relació directa amb el tipus de reaccions que catalitzen, que poden utilitzar substractes endògens i exògens.

En la rata, les principals isoformes involucrades en el metabolisme de compostos exògens són les que s'estudien en aquest treball: CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1, CYP3A1/2 i la subfamília CYP2C que inclou les subsubfamílies CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11 i CYP2C13.

(ref. 10)

### *1.1.1.2 Distribució en Teixits de Rata*

El complex CYP450 està distribuït en diferents òrgans de la rata: fetge, ronyons, pulmó, intestins, glàndula adrenal, testicles, pell, melsa i cervell. El fetge però, és on hi ha una major expressió. El número d'isoformes del CYP450 en la rata, així com els al·lels que codifiquen per aquests CYP450 es troba descrit a la pàgina web, CytochromeP450 Homepage (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

Determinades formes CYP450 es troben expressades només en rates mascle, mentre que d'altres són específiques de rata femella. L'activitat CYP450 és diferent segons el sexe, i sol ser molt més baixa en femelles que en mascles. Aquesta diferència en l'activitat està relacionada amb el cicle d'alliberació de la hormona del creixement (GH), entre d'altres factors. L'edat, els estats fisiològics, la dieta, així com les alteracions fisiopatològiques també poden modificar l'expressió de les CYP450.

En el fetge de rata hi ha isoformes constitutives i isoformes que es poden induir, i al mateix temps hi ha isoformes predominants en rates mascle, predominants

## Introducció

en rata femella, i presents en els dos sexes sense diferència. A la Taula 1 es detallen les isoformes presents en rata Sprague Dawley mascle, que és l'animal d'experimentació utilitzat en aquest estudi.

**Taula 1 Isoformes CYP450 Hepàtiques Constitutives i No Constitutives en Rata, i la Seva Especificitat**

<b>Isoforma</b>	<b>C/Ind</b>	<b>Especificitat</b>
CYP1A1	Ind	N
CYP1A2	Ind	F-d
CYP2A1	Ind	F-d
CYP2A2	C	M
CYP2B1	Ind	M-d
CYP2B2	Ind	M-d
CYP2C6	Ind	N
CYP2C7	C	F-d
CYP2C11	C	M
CYP2C12	C	F
CYP2C13	C	M
CYP2C22	C	M
CYP2D1	C	M-d
CYP2E1	Ind	F-d
CYP3A1	Ind	M-d
CYP3A2	Ind	M

*C/Ind: Enzim constituït / enzim que es pot induir*

*N: No especificitat dependent del sexe*

*F: Isoforma específica de rates femella*

*F-d: Isoforma dominant en rates femella*

*M: Isoforma específica de rates mascle*

*M-d: Isoforma dominant en rates mascle*

Les isoformes més rellevants en abundància són: CYP2C11, CYP3A1/2, i CYP2C13.

(ref. 10, ref. 11, ref. 12, , ref. 13, ref. 14, ref. 15)

### 1.1.2 *Matriu : Microsomes Hepàtics de Rata (RLM)*

Els microsomes són petites vesícules que es formen per fragmentació quan s'homogeneïtza el fetge. Aquestes vesícules estan compostes de forma

majoritària per reticle endoplasmàtic, principalment llis, i la resta són fragments vesiculats de la membrana plasmàtica, del complex de Golgi, dels endosomes i de les mitocondries. En mamífers, el complex CYP450 pot arribar a ser fins el 20% de la proteïna total del reticle endoplàsmic en el fetge.

Els microsomes contenen un sistema generador de NADPH, que és un sistema dirigit per l'enzim NADPH-citocrom P450 reductasa, que com el CYP450, està ancorat a la cara externa de la membrana del reticle endoplasmàtic mitjançant la regió hidrofòbica de l'extrem amino-terminal. Com s'ha vist a la Figura 2 i a la Figura 3, la seva funció és catalitzar el pas d'electrons del NADPH a la CYP450. Els electrons intervenen en la reducció del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , i en la formació de l'espècie activada de l'oxigen que s'insereix dintre del substrate oxidant-lo. L'esquema de funcionament es detalla a la secció 5.2.3.

(ref. 1, ref. 2, ref. 8, ref. 16)

### **1.1.3 *Substrates i Inhibidors Específics***

#### **1.1.3.1 *Substrates Específics***

Les isoformes de CYP450 presenten especificitat diferent pels substrates, encara que, la majoria de vegades es solapen, és a dir, els xenobiòtics se solen metabolitzar per varis CYP450. Només alguns compostos són "exclusivament" metabolitzats per una isoforma o tenen un metabòlit que es produeix únicament o de forma majoritària per una isoforma (metabòlit isoforma-específic). Aquests són els compostos que es fan servir per la caracterització de les activitats de les isoformes CYP450 al laboratori.

Els substrates específics que es fan servir en aquest estudi són la clorzoxazona (CZX), el dextrometorfà (DEX), l'etoxiresorufina (ERO) i la pentoxiresorufina (PRO) que són específics pels CYPs 2E1, 2D1, 1A1/2 i 2B1/2, respectivament, i la testosterona (TST) és substrate específic dels CYPs 2A1/2, 2C, 2C11 i 3A1/2.

Caldria senyalar que tots els CYP450 tenen la característica de metabolitzar per hidroxilació la TST, excepte el CYP2E1. En aquest treball, la TST és el substrate específic seleccionat per l'estudi de l'activitat del CYP2C,

## **Introducció**

CYP3A1/2 i CYP2A1/2. Les isoformes del grup de les CYP2C i la CYP3A1/2, metabolitzen la TST per hidroxilació en la posició 6 $\beta$ , tenint en compte però, que per la CYP3A1/2 suposa la principal via d'hidroxilació. El CYP2C11 es caracteritza per hidroxilar la TST principalment posició 2 $\alpha$ , encara que també l'hidroxila en posició 16 $\alpha$ , com diferents isoformes de la subfamília CYP2C. El CYP2A1/2 hidroxila la TST en posició 7 $\alpha$ . Veure Taula 2.

(ref. 4)

### **1.1.3.2 Inhibidors Específics**

Es defineix com inhibidor específic, aquella molècula que a la concentració en la que inhibeix el 50% de l'activitat d'una isoforma CYP450, és unes 100 vegades més petita que la concentració necessària per inhibir una altra isoforma.

Els inhibidors en general actuen de forma reversible o bé de forma irreversible o quasi-irreversible. En la primera forma, i sense haver pràcticament metabolisme de la molècula, l'inhibidor competeix pel centre actiu de l'enzim (inhibició competitiva); inhibidor i enzim s'uneixen a llocs diferents de l'enzim (inhibició no competitiva); l'inhibidor només s'uneix a l'enzim quan aquest ja està unit al substrate (inhibició acompetitiva). En la segona forma, l'inhibidor s'uneix de forma que no se separa del centre actiu de l'enzim i el bloqueja.

En general, els substrates específics i els inhibidors específics s'utilitzen com a eines que s'utilitzen per a demostrar la implicació d'un determinat CYP450 en una reacció.

Els inhibidors específics s'utilitzen en aquest estudi per fer les proves de control negatiu dels experiments, i són els que es mostren a la Taula 2 de la secció 4.1.4.

(ref. 17)

## **1.2 Anestèsics i Analgèsics**

Quan s'elabora un protocol experimental per l'estudi del metabolisme d'un fàrmac per CYP450 en fetge de rata de laboratori, s'han d'avaluar les interaccions potencials dels anestèsics/analgèsics administrats a la rata per

iniciar el procés quirúrgic. És important considerar els efectes de l'anestèsia/analgesia, entre d'altres factors com el procediment quirúrgic.

Una bona anestèsia/analgesia és imprescindible pel benestar de l'animal, i s'ha de considerar durant tot el procés experimental, encara que el procediment finalitzi amb el sacrifici de l'animal. Al mateix temps, per seleccionar els anestèsics/analgèsics que es faran servir, s'haurien de conèixer els possibles efectes d'aquests sobre el metabolisme del fàrmac a estudiar per poder interpretar correctament els resultats obtinguts. Dels anestèsics i analgèsics utilitzats en el present estudi existeixen poques dades sobre les seves interaccions amb el complex CYP450 hepàtic, i aquesta informació, és la que es pretén obtenir en el present treball.

A continuació es descriuen els analgèsics i anestèsics que s'utilitzen, i que es fan servir més freqüentment en l'experimentació animal. A la descripció de cada fàrmac, s'afegeixen les dades publicades en estudis realitzats *in vivo* en rata o *in vitro* en els RLM.

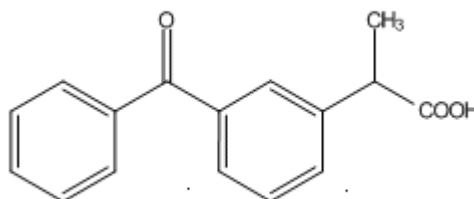
### 1.2.1 *Ketoprofè, KT*

El KT (Figura 4) és un analgèsic NSAID (fàrmac antiinflamatori no-esteroïdal) derivat de l'àcid (2-(3-Benzoilfenil)propanoic, que conté un grup quiral. S'administra normalment com a barreja racèmica (50:50) dels enantiòmers (*S*) i (*R*). L'enantiòmer (*S*) és l'isòmer amb més activitat farmacològica, l'isòmer (*R*) té poca o cap activitat farmacològica.

En rata, el KT s'elimina inalterat principalment conjugat per via biliar (87%), i la resta en orina (11%). Només una part poc significativa del KT administrat s'hidroxila per després eliminar-se.

Les concentracions trobades en plasma de rata estan entre els 100 i 300 µg/ml després de l'administració d'una dosi de 10 mg/kg per les vies i.p. i i.v., respectivament; i la unió a proteïnes plasmàtiques està al voltant del 97% ( $f_u=0.029$ ).

**Figura 4 Estructura Química del Ketoprofè (KT)**



(ref. 18, ref. 19, ref. 20, ref. 21, ref. 22)

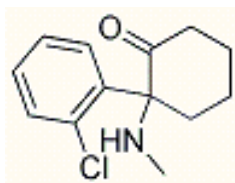
### **1.2.2 Ketamina, KTA**

La KTA ((±)-2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexanona clorhidrat, Figura 5) és un anestèsic que proporciona a més una profunda analgèsia. És una molècula quiral que es disposa normalment com una barreja racèmica (50:50) dels isòmers (*R*) i (*S*), i que presenta una enantioselectivitat farmacocinètica i farmacodinàmica així com diferents propietats d'absorció i metabolisme.

La norketamina (N-desmetilació de la KTA) és el principal metabòlit i representa aproximadament un 26% de la KTA metabolitzada pels RLM. La KTA i els seus metabòlits s'eliminen com a conjugats en orina i en bilis.

Les concentracions màximes trobades en plasma de rata, després de l'administració d'una infusió de 10 mg/kg/min durant 5 min, estan al voltant de 10 µg/ml, i la unió a proteïnes plasmàtiques de rata està al voltant del 38% (fracció no unida,  $f_u=0.62$ ).

**Figura 5 Estructura Química de la Ketamina (KTA)**



(ref. 23, ref. 24, ref. 25, ref. 26, ref. 27, ref. 28, ref. 29, ref. 30, ref. 31, ref. 32, ref. 33, ref. 34, ref. 35, ref. 36, ref. 37, ref. 38)

**1.2.3 Buprenorfina, BN**

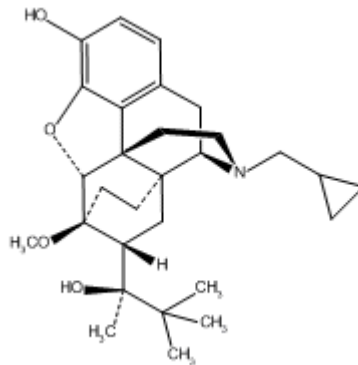
La BN ([5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ (S)]-17-(ciclopropilmetil)- $\alpha$ -(1,1-dimetiletíl)-4,5-epoxi-18,19-dihido-3-hidroxi-6-metoxi- $\alpha$ -metil-6,14-etenomorfinan-7-metanol clorhidrat, (Figura 6) és un potent analgèsic derivat de l'alcaloide de la morfina, la tebaïna.

Després de la seva administració s'elimina principalment inalterada i conjugada (glucuroconjugada) en la bilis. Una petita part de la BN és desalquila al fetge (norbuprenorfina) i després s'elimina conjugada en bilis. L'eliminació en bilis és aproximadament del 90% de la dosi administrada.

Les concentracions trobades en plasma de rata després de l'administració estan entre 0.01 i 5  $\mu$ g/ml després de l'administració i.v. de les dosi de 0.008 i 3 mg/kg, respectivament. Els valors d'unió a proteïnes plasmàtiques determinats *in vitro*, són de 88.9% i de 95.3% a concentracions de BN de 0.2 i 5 ng/ml, respectivament. Els valors trobats d'unió a proteïnes en experiments *in vivo* són de 34.7% i de 5.3% a concentracions (en plasma) de BN de 0.46 i 0.82 ng/ml, respectivament.



**Figura 6 Estructura Química de la Buprenorfina (BN)**



(ref. 39, ref. 40, ref. 41, ref. 42, ref. 43, ref. 44, ref. 45, ref. 46)

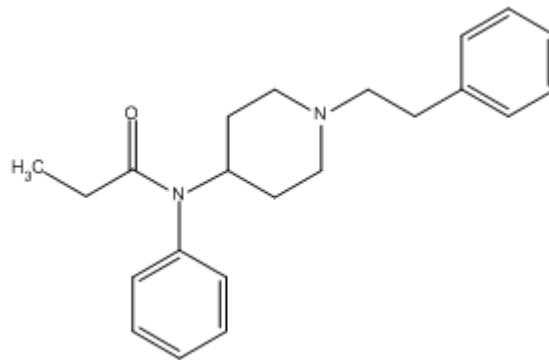
#### **1.2.4 Fentanil, FEN**

El FEN (N-fenil-N-[1-(2-feniletíl)-4-piperidinil]propanamida citrat, Figura 7 és un opioide sintètic que es fa servir en procediments quirúrgics que necessiten anestèsia.

El FEN es metabolitza principalment en el fetge, i es forma com a metabòlit majoritari el norfentanil (N-desalquilació del FEN). Està publicat que el CYP3A1/2 és l'enzim responsable de la formació del norfentanil a partir del FEN incubat en RLM. De la mateixa manera, s'ha descrit que el FEN inhibeix o interacciona amb el CYP2D1 quan s'incuba amb els RLM.

La concentració trobada en plasma de rata després de l'administració d'una dosi de 50 µg/kg per via i.v., és de aproximadament de 0.15 µg/ml, i la unió a proteïnes plasmàtiques de rata està sobre el 83% ( $f_u=0.17$ ).

**Figura 7 Estructura Química del Fentanil (FEN)**



(ref. 47, ref. 48, ref. 49, ref. 50, ref. 51, ref. 52, ref. 53, ref. 54)

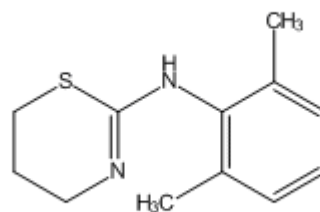
### 1.2.5 *Xilacina, XYL*

La XYL (2-(2,6-dimetilfenilamino)-5,6-dihidro-4H-tiacina clorhidrat) és un agent sedatiu i analgèsic, anàleg de la clonidina, que actua com a depressor del sistema nerviós central (SNC). S'utilitza en animals com a tranquil·litzant i relaxant muscular, i s'administra normalment en combinació amb altres anestèsics com la KTA.

Després de l'administració aproximadament el 70% de la dosi s'elimina en orina (el 8% de forma inalterada) i el 30% en femta, i no sembla que hagi recirculació enterohepàtica perquè l'eliminació biliar és comparable a la de la femta. El metabòlit majoritari (*N*-(2,6-dimetilfenil)tiourea) és un 35% de la dosi administrada, i els productes finals del metabolisme són el sulfat inorgànic i el CO<sub>2</sub>.

La concentració màxima trobada en sang de rata després de l'administració d'una dosi de 20 mg/kg per via i.m., és de 18 µg/ml.

**Figura 8 Estructura Química de la Xilacina (XYL)**



(ref. 55, ref. 56, ref. 57, ref. 58, ref. 59, ref. 60)

### **1.3 Interaccions Farmacològiques en el Metabolisme del Complex CYP450 Hepàtic**

Les interaccions farmacològiques, farmacocinètiques i farmacodinàmiques, es produeixen quan es modifica l'efecte d'un fàrmac per l'administració conjunta amb un altre fàrmac. Les interaccions farmacocinètiques a nivell del metabolisme del CYP450 es divideixen en interaccions enzimàtiques per inhibició o per inducció. Quan s'inhibeix el funcionament del CYP450 pot augmentar l'exposició plasmàtica al fàrmac i potser donar toxicitat; i quan s'indueix el funcionament, pot disminuir la concentració plasmàtica i potser no arribar als efectes terapèutics desitjats.

Els anestèsics i els analgèsics s'administren de forma simultània amb fàrmacs que s'estudien en rates de laboratori, i l'administració concomitant d'un anestèsic/analgèsic amb la molècula objecte d'estudi, podria alterar la disposició i donar el que s'ha anomena una interacció metabòlica entre fàrmacs.

Com hem vist abans, les inhibicions enzimàtiques es classifiquen de forma global en reversibles i irreversibles. Les reversibles es caracteritzen per ser concentració/dosi-dependent, d'inici ràpid i transitòries, perquè es recupera la capacitat metabòlica de l'enzim quan s'elimina l'inhibidor. Són les principals causants de les interaccions fàrmac-fàrmac. Les interaccions irreversibles són dosi i temps-dependents, són reaccions d'inici lent i l'enzim no recupera la seva capacitat metabòlica. Existeixen varis tipus d'inhibició reversibles: Competitiva, No Competitiva, Acompetitiva i Mixta.

Davant la pregunta si un fàrmac pot alterar per inhibició el metabolisme per CYP450 d'un altre, s'haurien d'identificar els isoenzims responsables del metabolisme de cada fàrmac.

De la mateixa manera, el més important és tenir en compte si aquesta interacció *in vitro* es donaria *in vivo*. Per això, es comparen les concentracions plasmàtiques terapèutiques del fàrmac "inhibidor", amb la constant d'inhibició relativa a l'enzim ( $K_i$ ). Si la concentració en plasma és més gran que la  $K_i$ ,

existeix una possibilitat que es donin interaccions. Si per contra, les concentracions plasmàtiques són més baixes que la  $K_i$ , és bastant probable que no es donin.

(ref. 61, ref. 62, ref. 63, ref. 64, ref. 65, ref. 66, ref. 67, ref. 68, ref. 69, ref. 70)



## **2 OBJECTIU**

En el present treball es determinen les interaccions potencials per inhibició en l'activitat dels principals CYP450 hepàtics en la rata, per alguns anestèsics i analgèsics (Ketoprofè, Ketamina, Buprenorfina, Fentanil i Xilacina). L'estudi es porta a terme mitjançant experiments *in vitro* en un sistema d'incubacions en microsomes de fetge de rata. Les isoformes on s'estudien les possibles interaccions en la seva activitat són: CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1 i CYP3A1/2.

Per assolir aquest objectiu global, es va obtenir i caracteritzar el sistema experimental (microsomes de fetge de rata), es van posar a punt sistemes analítics per avaluar les cinètiques enzimàtiques, i es van desenvolupar models cinètics pel tractament de les dades experimentals.



### **3 PLA DE TREBALL**

Per aconseguir l'objectiu global, es van dissenyar una sèrie d'experiments *in vitro* que es detallen a continuació:

#### *I. Obtenció dels RLM.*

Es va procedir a l'extracció dels fetges de les rates, i després amb ells es van obtenir suspensions de microsomes. El mètode de precipitació amb calci i el mètode d'ultracentrifugació són els dos processos que es van fer servir per obtenir els diferents lots de RLM.

#### *II. Caracterització del sistema experimental.*

Una vegada obtinguda la matriu experimental, els RLM, aquesta es va caracteritzar per obtenir informació de la seva funcionalitat metabòlica. Les proves de caracterització van ser les habitualment establertes per aquestes matrius:

- a) Es va mesurar la quantitat de proteïna microsomal per ml de suspensió de microsomes.
- b) Es va determinar la concentració del CYP450 total de cada lot de microsomes.
- c) Es va determinar l'activitat de la NADPH-CYP450 reductasa de cada lot de microsomes.

#### *III. Metodologia analítica.*

Els metabòlits formats en cada reacció específica es van quantificar per HPLC amb detecció UV o fluorescència. Per aquesta raó, es van posar a punt mètodes analítics, per cada reacció específica.

#### *IV. Linealitat en la producció de metabòlit específic en funció de la concentració de proteïna i del temps d'incubació.*



A continuació, es va estudiar la linealitat de la producció de cada metabòlit provinent de cada substrate CYP-específic, en funció de la concentració de proteïna microsomal i en funció del temps d'incubació. Aquestes dos proves es van repetir de forma individual per a cada isoforma CYP450 amb el seu substrate específic, amb la finalitat de seleccionar una concentració de proteïna i un temps d'incubació per posteriorment procedir a l'estudi cinètic. La regressió lineal simple va ser l'equació utilitzada per ajustar a les dades obtingudes dels experiments.

*V. Cinètica enzimàtica.*

L'estudi cinètic va consistir en la realització d'una sèrie d'incubacions de RLM a concentracions creixents de substrate específic. Tot això preparat a la concentració de la proteïna microsomal i al temps d'incubació fixats segons els resultats obtinguts al punt anterior (punt IV). El procediment es va repetir de forma individual per a cada isoforma CYP450.

Les equacions de Michaelis-Menten (M-M) i de Hill es van utilitzar per ajustar les dades obtingudes dels experiments. Els paràmetres  $K_m$  i  $V_{max}$  que són els que defineixen la cinètica d'un enzim, es van determinar per a cadascuna de les isoformes CYP450 de l'estudi.

*VI. Estudi in vitro d'inhibició de les isoformes CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, el KT, la BN i el FEN i la XYL.*

Una vegada caracteritzat el sistema experimental es van dissenyar els experiments per estudiar la inhibició del CYP450 pels fàrmacs anestèsics i analgèsics.

Es van obtenir els paràmetres d'inhibició  $K_i$  i  $IC_{50}$  (concentració d'inhibidor que disminueix l'activitat màxima d'un enzim a la meitat). El valor de la  $K_i$  es va determinar utilitzant tres mètodes diferents per comparar entre els valors obtinguts:

A. Mètode de regressions no-lineals simultànies, SNLR. Que inclou el desenvolupament de models d'inhibició no descrits en bibliografia.

B. Mètode de la "K<sub>m,app</sub>"

C. Mètode "IC<sub>50</sub>-to-K<sub>i</sub> Converter"

*VII. Unió no-específica a proteïnes microsomals.*

De forma paral·lela es va determinar la unió no específica dels fàrmacs als microsomes. Per això es va determinar la fracció no unida a proteïnes microsomals,  $f_{u,mic}$ . El  $f_{u,mic}$  és un factor de correcció que es multiplica pels valors de les  $K_i$  per obtenir els valors de  $K_i$  no unida. Es van utilitzar dos tècniques per obtenir aquest factor: la tècnica o mètode experimental *in vitro* (per la KTA) i la tècnica o mètode *in silico* (per tots els fàrmacs inclosa la KTA).

*VIII. Predicció de potencials interaccions in vivo.*

Per determinar la possibilitat d'interferència del anestèsic/analgèsic en el metabolisme del fàrmac en estudi, es van comparar els valors de  $K_i$  obtinguts amb les concentracions plasmàtiques terapèutiques en rata, això es va fer utilitzant el càlcul indicat en la directriu d'interaccions de la FDA.



## **4 MATERIAL**

### **4.1 Material i Equips Generals**

#### **4.1.1 *Anestèsics***

La barreja racèmica de la KTA clorhidrat va ser amablement proveïda per Chemo Iberica, S.A. La XYL clorhidrat va ser subministrada per Sigma-Aldrich Co.

#### **4.1.2 *Analgèsics***

El KT, el FEN citrat i la BN clorhidrat van ser proveïts per Sigma-Aldrich Co.

#### **4.1.3 *Matrius***

Els RLM utilitzats van ser els lots 008HRSDMC, 009HRSDMC, 010HRSDMC i 029HRSDMC preparats a partir de “pools” de diferents animals per aquest treball.

## Material

### 4.1.4 Reactius

**Taula 2 Reactius: Substrates i Metabòlits Específics, Estàndards Intern i Inhibidors Específics Utilitzats en les Reaccions del CYP450.**

	nom	pes molecular	proveïdor	prova CYP
<b>Substrate específic</b>	clorzoxazona	169.57	Sigma	CYP2E1
	dextrometorfà	370.32		CYP2D1
	etoxiresorufina	241.24		CYP1A1/2
	pentoxiresorufina	283.32		CYP2B1/2
	testosterona	288.42		CYPs2A1/2, 2C, 2C11 i 3A1/2
<b>Metabòlit estàndard de referència</b>	6-hidroxiclorzoxazona	185.56	Sigma	CYP2E1
	dextrorfà-D-tartrat	407.46	RBI	CYP2D1
<b>Estàndard intern</b>	resorufina	213.19	Sigma	CYP1A1/2 i 2B1/2
	6-β-hidroxitestosterona	304.42	Sigma	CYP3A1/2 CYP2C11 CYP2A1/2 CYP2C
<b>Inhibidor específic</b>	5-clorooxiindol	167.59	Sigma	CYP2E1
	levallorfa	433.49	RBI	CYP2D1
	4-metil-7-hidroxycumarina	176.17	Sigma	CYP1A1/2 i 2B1/2
	dexametasona	392.46	Sigma	CYPs2A1/2, 2C, 2C11 i 3A1/2
<b>Inhibidor específic</b>	dietilditioncarbamàt	225.31	Sigma	CYP2E1
	quinidina	378.89		CYP2D1
	α-naftoflavona	272.3		CYP1A1/2
	orfenadrina	461.5		CYP2B1/2
	sulfafenazol	314.36		CYP2C
	cimetidina	252.34		CYP2C11
	cumarina	146.14		CYP2A1/2
	troleandomicina	813.97		CYP3A1/2

Els reactius utilitzats per crear un sistema generador de NADPH a totes les incubacions amb RLM consistia en: La β-nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (β-NADP), la dextro-glucosa-6-fosfat (D-G-6P), i l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G-6P-DH) obtinguts de Sigma Aldrich Co., i el clorur de magnesi hexahidratat (MgCl<sub>2</sub>)·6H<sub>2</sub>O obtingut de Merck Co.

Els altres reactius i solvents utilitzats eren d'alta puresa química i comercialment disponibles.

### 4.1.5 Solvents i Productes per Solucions Reguladores del pH

- Aigua (Milli-Q)
- Sodi dihidrogenfosfat monohidrat (Merck)
- Disodi hidrogenfosfat dihidrat (Merck)

- Tris-hidroximetil aminometà (Merck)
- Àcid clorhídric al 37% (Merck)
- Acetonitril per HPLC (SDS, Panreac)
- DMSO (Merck)
- Metanol per HPLC (Panreac)
- Àcid acètic glacial (Merck)

#### **4.1.6 Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC)**

- Sistema de cromatografia HPLC compost per:
  - Sistema bomba-injector 2695 Separation Module (Waters)
    - Detector espectrofotomètric de doble longitud d'ona 2487 (Waters)
  - Sistema de cromatografia HPLC compost per:
    - Bomba M600 (Waters)
    - Detector espectrofotomètric de doble longitud d'ona 2487 (Waters)
    - Sistema mostrejador Prospekt Marathon (Spark-Holland)
- Columnes:
  - Supelcosil (LC-18DB) (150 x 4.6 mm, 5 µm, Supelco)
  - Xterra RP18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, Waters)
  - Symmetry C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, Waters)

#### **4.1.7 Equips Varis**

- Bany termostàtic amb agitació Unitronic-Orbital (Selecta)

## ***Material***

- Bany termostàtic sec amb agitació Thermomixer compact (Eppendorf)
- Congeladors -20°C, -80°C.
- pH-metre (Methrohm)
- Balances analítiques (Mettler)
- Centrífugues refrigerades (Sorvall, Eppendorf)

### **4.2 Material per l'Extracció de Fetge i l'Obtenció de RLM**

- Material quirúrgic divers en el procediment per l'extracció de fetge i l'obtenció de microsomes.
- Homogenitzador de teixits "Potter-Elvehjem"
- Centrífugues refrigerades Sorvall SA-600 i Sorvall RC28S
- Rotor Sorvall F-28/36

### **4.3 Animals**

- Rates mascle Sprague-Dawley d'entre 8 i 16 setmanes d'edat en el moment de la seva utilització.

### **4.4 Caracterització Funcional dels Lots de RLM**

#### ***4.4.1 Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal***

- Total Protein Kit, Sigma-Aldrich Co.
- Espectrofotòmetre Multiskan Spectrum (Thermo Electron)

#### ***4.4.2 Determinació del Citocrom P450 en RLM***

- Ditionit sòdic proveït per Aldrich Co.
- Bombona de monòxid de carboni (CO) amb manoreductor i vàlvula de precisió, i localitzada dintre d'un sistema d'extracció d'aire.

- Espectrofotòmetre Multiskan Spectrum (Thermo-Electron).

#### **4.4.3 *Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM***

- NADPH (Sigma-Aldrich, Co.)
- Citocrom C forma fèrrica (Sigma-Aldrich, Co.)
- Espectrofotòmetre Multiskan Spectrum (Thermo-Electron).

#### **4.5 *Cinètiques Enzimàtiques***

- Reactius especificats a la Taula 2 de la secció 4.1.4., excepte els inhibidors específics.
- Reactius utilitzats per crear un sistema generador de NADPH, especificats a la secció 4.1.4.

#### **4.6 *Estudi d'Inhibició In Vitro de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN***

- Reactius especificats a la Taula 2 de la secció 4.1.4.
- Reactius utilitzats per crear un sistema generador de NADPH, especificats a la secció 4.1.4.

#### **4.7 *Determinació de la Unió In Vitro de la KTA a Proteïnes Microsomal. Model In Vitro***

- Sistema generador de NADPH (secció 4.1.4).
- Centrifree YM-10.
- Es van preparar dos tipus de matrius per fer aquest estudi: les mostres de microsomes de fetge de rata (RLMS) i la matriu filtrada (FMS).
- Les RLMS estaven compostes per RLM a una concentració de proteïna microsomal de 1 mg/ml en el volum final en solució tampó fosfat sòdic 100



## ***Material***

mM pH 7.4, i en presència de D-G-6P 4 mM, G-6P-DH 2 U/ml i MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

- Les FMS es van preparar a partir d'alíquotes de RLMS filtrades en tubs Centrifree YM-10 a 5000 xg durant 1 h a 25°C.

### **4.8 Programes Informàtics**

- Programa Millennium 32 v3.05.01® (Waters), controlador del sistema cromatogràfic HPLC.
- Programa Empower 2® (Waters), controlador del sistema cromatogràfic HPLC.
- Programa SkanIt®, controlador del espectrofotòmetre Multiskan
- Programa WinNonlin®, programa de tractament de dades farmacocinètiques i farmacodinàmiques.
- Programa NCSS®, tractament estadístic de dades.

## **5 MÈTODES**

### **5.1 Procediment per l'Extracció de Fetge de Rata i l'Obtenció de RLM**

Les rates es van sotmetre a dejú (amb accés a aigua de beguda) aproximadament 18 hores abans començar el procés.

Els animals es van sacrificar mitjançant concussió i dislocació cervical. Durant el procediment sempre es va controlar i anotar l'hora de sacrifici, extracció, inici de perfusió / final de perfusió, temps d'isquèmia calenta i freda de l'òrgan, amb l'objectiu de normalitzar el procediment.

Una vegada sacrificats els animals, es va procedir ràpidament a realitzar una laparotomia per la línia alba seguida de seccions transversals caudals dels arcs costals i de la paret de l'àrea caudal de l'abdomen. Per accedir al tòrax es va extreure l'estèrnum mitjançant talls als dos costats d'aquest, en direcció cranial. Es va retirar l'estèrnum en direcció cranial i es va seccionar a la base.

La perfusió es va realitzar en algunes rates *in situ* i en altres en l'òrgan aïllat. Per aïllar l'òrgan es va procedir a seccionar els vasos de l'òrgan i qualsevol altre element sense alterar el mateix. Ràpidament el fetge es va netejar i es va col·locar aïllat en un bany fred de sèrum fisiològic. Seguidament es va col·locar una brànula a l'artèria porta i es va iniciar la perfusió. El temps màxim de perfusió va ser de 5 minuts.

Una vegada finalitzada la perfusió es va traspasar l'òrgan a una altra cubeta que contenia gel i solució freda de sèrum fisiològic per la neteja de tot teixit accessori. Finalment es va pesar l'òrgan abans de començar la producció de microsomes.

#### *Homogenització*

L'òrgan recent obtingut, es va trossejar en una placa de Petri situada a sobre d'una safata amb gel. Els fragments, de 2-3 g de pes, es van submergir en uns mililitres de solució tamponada de Tris.HCl 50 mM pH 7.4 que contenia KCl 154 mM. A continuació, es van introduir en el tub a on es van

## *Mètodes*

homogenitzar amb el sistema “Potter-Elvehjem”. Una vegada homogenitzat, es va buidar el contingut en un recipient que contenia un 80% de Tris.HCl 50 mM pH 7.4 amb KCl 154 mM.

### *Obtenció de la fracció post-mitocondrial*

L'homogenitzat es va centrifugar a 10.000 x g durant 20 min a 4°C. Al final de la centrifugació es va descartar la capa lipídica superficial i es van recollir acuradament els sobrenedants (fracció post-mitocondrial).

### *Obtenció de la fracció microsomal*

#### *A. Mètode de precipitació amb Calci*

A la mateixa proveta es va afegir una solució freda de clorur càlcic 88 mM en una proporció de 100 µl per cada ml de sobrenedant post-mitocondrial. Es va transvasar la solució a un got de precipitats, es va agitar i es va mantenir durant 10 min en una safata amb gel. Al final d'aquest període es va tornar a centrifugar a 26.400 xg durant 15 min. El sobrenedant obtingut es va descartar acuradament. Es va resuspendre el sediment i es va repetir l'operació a 26.400 xg durant 15 min a 4°C. Per segona vegada es va descartar el sobrenedant i el sediment final es va resuspendre en solució tampó Tris.HCl 50 mM pH 7.4 amb KCl 154 mM.

#### *B. Mètode d'ultracentrifugació*

Es va centrifugar la fracció post-mitocondrial a 100.000 x g durant 60 min a 4°C. Després de la centrifugació es va descartar el sobrenedant (fracció del citosol) i es va resuspendre el sediment amb Tris.HCl 50 mM pH 7.4 amb KCl 154 mM.

En tot moment el procés es va mantenir la matriu en fred (en safata amb gel).

(ref. 73, ref. 74)

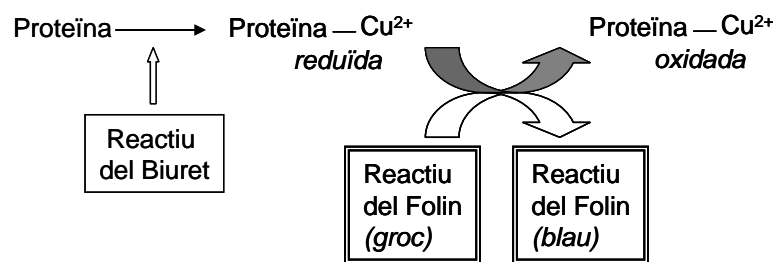
## 5.2 Caracterització Funcional dels Lots de RLM

### 5.2.1 Procediment per la Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal

Una vegada obtinguda la fracció microsomal del fetge de rata es va mesurar la concentració de proteïna microsomal. La mesura es va fer mitjançant el mètode colorimètric “Micro Lowry, Onishi & Barr Modification” (Total Protein Kit, Sigma-Aldrich Co.) que presenta un màxim d’absorció a 725 nm.

Es va determinar la concentració de proteïnes a dos dilucions de la mostra: 1:25 i 1:50, tal i com s’indica a la secció 6.1.1.

**Figura 9** Cicle de la Reacció del Biuret amb el Mètode *Folin-Lowry* per la Determinació de la Concentració de la Proteïna Microsomal.



(ref. 75)

### 5.2.2 Procediment per la Determinació de la Concentració de CYP450 en RLM

El mètode per quantificar el CYP450 en microsomes es basa en la mesura de l’espectre d’absorció per la forma reduïda del CYP450, que és la forma disponible per la unió del substrate.

En aquest procediment, el monòxid de carboni (CO) és la molècula que s’uneix al ferro en forma reduïda per formar un complex  $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ , i que presenta un màxim d’absorció del grup hemo a 450 nm. Aquesta propietat és precisament la que li va donar origen al nom de P-450, pigment (P) que absorbeix la llum a 450 nm. D’aquesta manera, el CO s’uneix amb una gran afinitat i impedeix la unió i l’activació de l’oxigen molecular, i en conseqüència, s’inhibeix de forma reversible l’activitat enzimàtica del P450.

## ***Mètodes***

Es van preparar suspensions de microsomes a una concentració de proteïna microsomal de 0.25 i 1 mg/ml en solució Tris.HCl 50 mM pH 7.4 : glicerol (80:20). A continuació, es va reduir el CYP450 afegint una petita quantitat de ditionit sòdic a les solucions preparades i es van fer lectures d'absorció des de 400 nm a 500 nm. Després es va bombollear la mostra amb CO durant 1 min, i finalment es va fer una altra sèrie de lectures d'absorció des de 400 nm a 500 nm. Aquesta lectura es va repetir per a cada concentració de suspensió de microsomes (n=2), segons es descriu a la secció 6.1.2.

Així doncs, la quantificació dóna informació de la concentració d'enzim CYP450 que es pot esperar en els diferents lots de RLM.

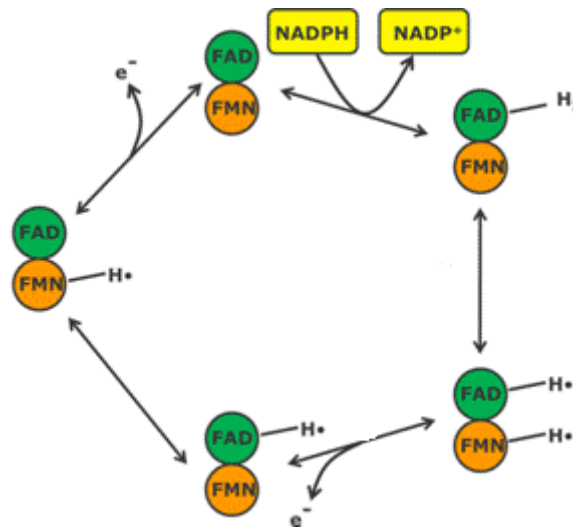
(ref. 76, ref. 77, ref. 78, ref. 79, ref. 80, ref. 81, ref. 82, ref. 83)

### ***5.2.3 Procediment per la Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM***

La NADPH-CYP450 reductasa és l'enzim que intervé en el cicle catalític del CYP450 transferint els electrons des del NADPH fins el grup hemo del CYP450, i per tant la seva activitat és un factor limitant del funcionament del complex. L'esquema de funcionament es mostra en la Figura 10.

Els electrons són transferits des del NADPH al grup hemo del CYP450 en diverses etapes. Primer el NADPH cedeix els electrons al cofactor flavina adenina dinucleòtid (FAD) que es converteix en a flavina mononucleòtid (FMN), i allibera dos electrons en cada cicle catalític. Aquests electrons són els que van al CYP450.

Figura 10 Cicle del Funcionament de la NADPH-CYP450 Reductasa.



FAD: flavina adenina dinucleòtid, FMN: flavina mononucleòtid, NADP: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat, NADPH: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat deshidrogenasa, H<sub>2</sub>: hidrogen, H•: protó, e<sup>-</sup>: electró.

La metodologia per quantificar l'activitat NADPH-CYP450 reductasa va consistir en quantificar el Citocrom C, que és una proteïna petita transportadora d'electrons que actua com a acceptora d'electrons i es redueix. Es quantifica per absorció el Citocrom C reduït, degut a que la mesura directa del propi NADPH-CYP450 reductasa és una tècnica complexa. El Citocrom C reduït presenta un màxim d'absorció a 550 nm.

Per la quantificació, la mostra estava composta per suspensió microsomal a 0.067 mg/ml (6.3% v/v), solució de la Citocrom C 5 mg/ml en Tris.HCl 50 mM pH 7.4 (10.4% v/v), i Tris.HCl 50 mM pH 7.4 (83.3% v/v). A continuació, la mostra es va pre-incubar durant 3 min a 37°C. Una vegada finalitzat el període de pre-incubació es va afegir la solució de NADPH (en Tris.HCl 50 mM pH 7.4), i immediatament es va mesurar l'absorció durant 50 segons. El procés es va fer per triplicat, i es detalla a la secció 6.1.3.

(ref. 2)

### **5.3 L'Incubat**

Es preparen incubats pels estudis de cinètica enzimàtica (quan la concentració de fàrmac és zero), i de la inhibició (en presència de fàrmac inhibidor).

Abans de començar els estudis de la cinètica enzimàtica i de la inhibició, caldria descriure com es preparen aquests processos en l'incubat.

L'incubat és una “barreja” de components que preparats en tubs eppendorf donen com a resultat una sèrie de reaccions enzimàtiques. En el present treball aquestes reaccions enzimàtiques són les que porten a terme els CYP450.

Els incubats estan formats pels microsomes (que contenen el CYP450), la solució tampó on té lloc la reacció, el sistema generador de NADPH (que permeten el funcionament del CYP450 i es detalla a la secció 4.1.4), el substrate específic, i la solució d'aturada de la reacció. El detall dels components es descriu a la Taula 6 i la Taula 7.

Les solucions de reactius es van incorporar de forma individual, seguint un ordre d'addició, perquè la reacció tingués lloc correctament. Primer es va afegir el tampó (TF 100 mM pH 7.4, Tris.HCl 50 mM pH 7.4, o Tris.HCl 50 mM pH 7.8), a continuació la suspensió de microsomes, tot seguit de la solució generadora de NADPH, però sense el  $\beta$ -NADP. Després, es van addicionar el substrate específic i, en el cas dels estudis de la inhibició, el fàrmac o inhibidor específic. Seguidament es va iniciar la reacció incorporant el  $\beta$ -NADP, i es va incubar a temperatura fisiològica durant el temps d'incubació seleccionat. En darrer lloc, la reacció es va interrompre quan es va afegir la solució d'aturada de la reacció específica corresponent.

Una vegada aturada la reacció, es procedeix a la preparació de les mostres per l'anàlisi. En darrer lloc, s'analitza. En aquest treball l'anàlisi de les mostres es fa per HPLC amb detecció UV o fluorescència (veure la secció 5.7).

## **5.4 Cinètiques Enzimàtiques**

Per realitzar aquests experiments, es va tenir en compte que menys d'un 20% de la concentració de substrate es consumís durant les incubacions, i a més, que la concentració d'enzim (concentració de proteïna microsomal) estigués "controlada" per no ser massa elevada.

(ref. 84)

### **5.4.1 *Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP450-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal***

Per a estudiar la linealitat de producció de metabòlit CYP450-específic en funció de la concentració de proteïna microsomal en l'incubat i el temps d'incubació, es van seguir les condicions d'incubació especificades a la següent Taula 3.

Es van preparar de forma individual, una sèrie d'incubats en què es va fixar el temps d'incubació però les concentracions de la proteïna microsomal variaven (Taula 3, A), i una altra sèrie d'incubats en què es va fixar la concentració de la proteïna microsomal però els temps d'incubació eren diferents (Taula 3, B). Els incubats es van preparar seguint l'ordre d'addició dels components segons es descriu a la secció 5.3.

Aleshores, les dues sèries d'experiments es van realitzar per a cada reacció específica, a la concentració de substrate específic pròxima a la  $K_m$  de la reacció en qüestió. Els valors de la  $K_m$  es van obtenir com a resultat d'una recerca bibliogràfica.



**Taula 3 Concentracions de Substrate Específic, Concentracions de Proteïna i Temps d'Incubació Utilitzats en la Determinació de la Linealitat de la Concentració de Proteïna i del Temps d'Incubació.**

CYP450	Concentració Substrate específic ( $\mu M$ )	A		B	
		Concentració de proteïna (mg/ml)	Temps d'incubació (min)	Temps d'incubació (min)	Concentració de proteïna (mg/ml)
CYP2E1	500	0.25, 0.5, 1 i 2	30	5, 10, 30, 60 i 120	1
CYP2D1	300	0.25, 0.5, 1 i 2	30	5, 10, 30, 60 i 120	1
CYP1A1/2	5	0.05, 0.1, 0.25, 0.5 i 1	5	0.5, 1, 2.5, 5, 10 i 30	0,5
CYP2B1/2	50	0.25, 0.5, 1 i 2	10	1, 5, 10, 30 i 60	1
CYP2A1/2	250	0.1, 0.25, 0.5 i 1	10	5, 10, 20 i 30	0,1
CYP2C					
CYP2C11					
CYP3A1/2					

A: Determinació de la linealitat en funció de la concentració de proteïna. Es fixa el temps d'incubació.

B: Determinació de la linealitat en funció del temps d'incubació. Es fixa la concentració de proteïna.

La quantificació dels metabòlits es va fer per HPLC amb detecció UV per totes les reaccions específiques, excepte per la reacció dextrometorfà-O-demetilasa, que es va fer per fluorescència, d'acord amb les tècniques descrites a la secció 5.7.

Les dades obtingudes es van tractar tal i com s'indica a la secció 6.2.1.

#### 5.4.2 Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics $K_m$ i $V_{max}$

Una vegada establerts el temps d'incubació i la concentració de la proteïna microsomal idonis per cada reacció específica, es va passar a estudiar la cinètica enzimàtica pròpiament, i a estimar els paràmetres cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$ . La cinètica enzimàtica consisteix en la determinació de les activitats enzimàtiques *versus* les concentracions de substrate específic per a cada reacció específica (8 reaccions específiques corresponents a 8 isoformes CYP450), tal i com es descriu a la secció 7.2.2. Per això, es van preparar de forma individual una sèrie d'incubats de microsomes a diferents concentracions de substrate específic. Les concentracions de substrate específic en cada reacció es van seleccionar segons dades bibliogràfiques trobades (concentracions per sota i per sobre del valor de la  $K_m$ ), i es mostren a la Taula 4.

Les condicions d'incubació es mostren a la Taula 4, i els incubats es van preparar seguint l'ordre d'addició dels components segons es descriu a la secció 5.3.

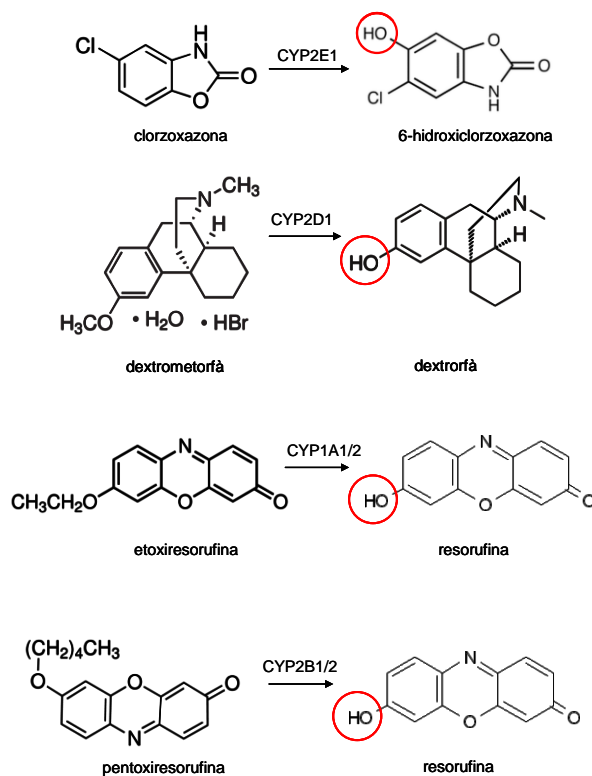
**Taula 4 Concentracions de Substrates Específics, Concentracions de Proteïna Microsomal, i Temps d'Incubació per Determinar les Diferents Cinètiques Enzimàtiques.**

CYP450	Reacció específica	Substrate específic	Concentracions Substrate específic ( $\mu\text{M}$ )	Conc. Proteïna microsomal (mg)	Temps d'incubació (min)
CYP2E1	Cloroxazona-6-hidroxilasa	cloroxazona	5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 i 2000	1	10
CYP2D1	Dextrometorfà-O-demetilasa	dextrometorfà	5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 i 2000	1	20
CYP1A1/2	Etoxi-resorufina-O-deetilasa	etoxi-resorufina	0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 i 10	0.5	10
CYP2B1/2	Pentoxi-resorufina-O-dealquilasa	pentoxi-resorufina	2, 5, 15 i 50	0.5	10
CYP2A1/2	Testosterona-7 $\alpha$ -hidroxilasa				
CYP2C	Testosterona-16 $\alpha$ -hidroxilasa	testosterona	10, 25, 50, 100, 200 i 500	0.5	10
CYP2C11	Testosterona-2 $\alpha$ -hidroxilasa				
CYP3A1/2	Testosterona-6 $\beta$ -hidroxilasa				

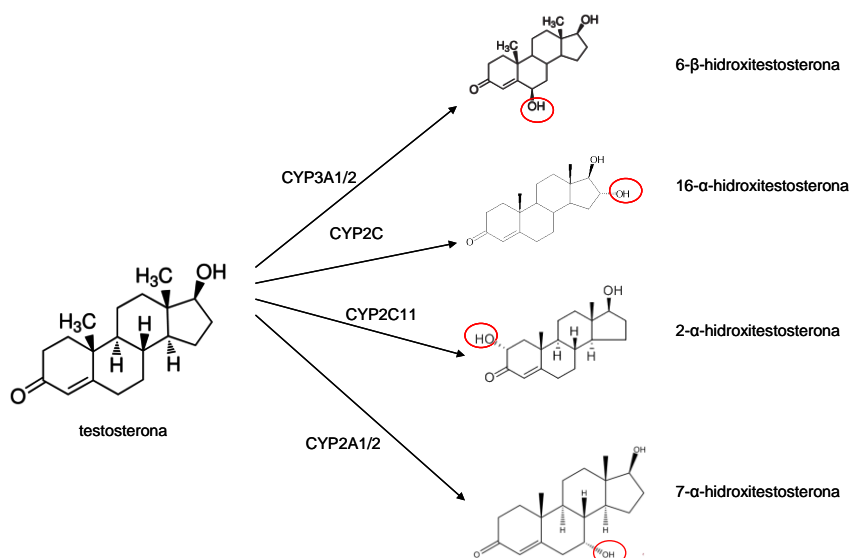
Els temps d'incubació i les concentracions de proteïna en cada reacció específica són els obtinguts dels experiments realitzats a la secció 5.4.1.

La Figura 11 mostra els substrates específics i els metabòlits específics de cada reacció CYP450-específica.

**Figura 11 Cinètiques Enzimàtiques: Reaccions Específiques. Substrates i Metabòlits Específics.**



**Figura 12 Cinètiques Enzimàtiques: Reaccions Específiques. Substrates i Metabòlits Específics. (Continuació).**



La quantificació dels metabòlits es va fer per HPLC amb detecció UV per totes les reaccions específiques, excepte per la reacció dextrometorfà-O-demetilasa, que es va fer per fluorescència, d'acord amb les tècniques descrites a la secció 5.7.

Les dades dels experiments es van tractar tal i com es descriu a la secció 6.2.2.

(ref. 86, ref. 87, ref. 88, ref. 89, ref. 90, ref. 91)

### 5.5 Estudi *In Vitro* d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN

Una vegada estimada la  $K_m$  de CYP450 amb el seu substrate específic, es van preparar de forma individual, una sèrie d'incubats de microsomes a cinc concentracions de fàrmac anestèsic/analgesic, per quatre concentracions de substrate específic. Les concentracions de substrate específic que es van escollir van ser valors per sota i per sobre del valor de la  $K_m$ . Les concentracions de fàrmac es van seleccionar en funció de la seva

concentració plasmàtica màxima trobada en bibliografia (es van seleccionar valors per sota i per sobre).

La concentració de la proteïna i el temps d'incubació es van fixar i estan indicats en els experiments de cinètica enzimàtica, secció 5.4.2. La Figura 13 mostra el disseny experimental que es va seguir per triplicat.

**Figura 13 Disseny Experimental per l'Estudi d'Inhibició (n=3).**

Substrate específic **	Fàrmac*				
	concentració 1***	concentració 2	concentració 3	concentració 4	concentració 5
concentració 1	□	□	□	□	□
concentració 2	□	□	□	□	□
concentració 3	□	□	□	□	□
concentració 4	□	□	□	□	□

\* : Ketoprofè, Ketamina, Buprenorfina, Fentanil, Xilacina.

\*\* : Clorzoxazona, Dextrometorfà, Etoixiresorufina, Pentoxiresorufina, Testosterona.

\*\*\* : Concentració de fàrmac = 0.

Dibuix tub d'assaig: Incubat.

A més, es van introduir una sèrie de controls per verificar la metòdica analítica i controls positiu i negatiu per validar el procés d'inhibició. La Taula 5 mostra els controls preparats per verificar el funcionament de les incubacions i de les anàlisis.

**Taula 5 Composició de les Mostres Control per Verificar la Metòdica Analítica.**

	Microsomes hepàtics de rata	Sistema generador de NADPH	Substrate específic	Fàrmac ( Inhibidor potencial )	Estàndard intern
Control 1	-	-	X	-	X
Control 2	X	X	-	X	-
Control 3	X	X	-	-	-

Sistema generador de NADPH : glucosa-6-fosfat, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, clorur de magnesi ,  $\beta$ -nicotinamida dinucleòtid fosfat

La mostra Control 1 es va preparar per verificar l'estabilitat del substrate específic i de l'estàndard intern en la solució tampó, a pH 7.4 o pH 7.8.

La mostra Control 2 es va preparar per verificar que no es metabolitza el fàrmac donant productes que tinguin el mateix temps de retenció que el metabòlit específic que es quantifica, i no apareguin interferències.

## ***Mètodes***

La mostra control 3 es va preparar per verificar que la matriu (RLM) i el sistema generador de NADPH (G-6P-DH, D-G-6P, clorur de magnesi i  $\beta$ -NADP) no formen cap molècula per degradació que interfereixi en l'anàlisi del metabòlit específic.

Els controls positiu i negatiu de la inhibició es van preparar com els incubats de l'experiments d'inhibició per cada reacció específica CYP450 però, substituint el fàrmac per un inhibidor de referència (control positiu) o pel seu solvent (control negatiu). Les concentracions d'inhibidor de referència utilitzades es van obtenir a partir de recerca bibliogràfica.

Els components i condicions de les incubacions pels estudis d'inhibició estan especificats a la següents Taula 6 i Taula 7.

La quantificació dels metabòlits es va fer per HPLC amb detecció UV per totes les reaccions específiques, excepte per la reacció dextrometorfà-O-demetilasa, que es va fer per fluorescència, d'acord amb les tècniques descrites a la secció 5.7.

Les dades obtingudes (producció de metabòlit específic *versus* la concentració de substrate específic per cada concentració de fàrmac) es van tractar tal i com s'indica a la secció 6.3.

**Taula 6 Composició dels Incubats pels Estudis de Cinètica Enzimàtica (Concentració de Fàrmac Zero) i Estudis d'Inhibició (en Presència de Fàrmac). CYP2E1, CYP2D1 i CYP1A1/2.**

	Activitats CYP450 específiques		
	Clorzoazona-6 $\beta$ -hidroxilasa CYP2E1	Dextrometorfà-O-demetilasa CYP2D1	Etoxirosorufina-O-deetilasa CYP1A1/2
<b>Condicions de l'incubació</b>			
Conc. proteïna microsomal (mg/ml)	1	1	0.5
Volum d'incubació (ml)	0.5	0.5	0.5
lots microsomes rata	008HRSDMC (KT) 009HRSDMC (KTA i BN) 010HRSDMC (FEN i XYL)	008HRSDMC (KT) 009HRSDMC (KTA i BN) 010HRSDMC (FEN) 029HRSDMC (XYL)	008HRSDMC (KT) 009HRSDMC (BN) 010HRSDMC (FEN i XYL) 029HRSDMC (KTA)
temps d'incubació (min)	10	20	10
tampó d'incubació	TF pH 7.4	TF pH 7.4	Tris pH 7.8
sistema generador de NADPH		G-6P-DH 2 U/ml, D-G-6P 4 mM i MgCl <sub>2</sub> 5 mM	
<b>Substrate específic / concentracions (<math>\mu</math>M) / solvent</b>	<b>CZX /</b> a: 50, 250, 500 i 1000 b: 100, 250, 500 i 1000 / AcN	<b>DEX /</b> c: 5, 25, 250 i 1500 d: 25, 250, 500 i 1500 e: 5, 25, 250 i 500 / AcN	<b>ERO /</b> f: 0.25, 5, 10 i 50 g: 1, 5, 10 i 50 h: 0.1, 0.25, 1 i 5 / AcN
<b>Fàrmac: /concentracions (<math>\mu</math>M) / solvent</b>	KT: 0, 0.025, 0.05, 1.25 i 5 mM / AcN KTA: 0, 5, 25, 75 i 375 $\mu$ M / DMSO BN: 0, 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5 $\mu$ M / AcN FEN: 0, 0.1, 0.5, 5 i 20 $\mu$ M / AcN XYL: 0, 2.5, 10, 50 i 250 $\mu$ M / AcN	KT: 0, 0.025, 0.05, 1.25 i 5 mM / AcN KTA: 0, 5, 25, 75 i 375 $\mu$ M / DMSO BN: 0, 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5 $\mu$ M / AcN FEN: 0, 0.1, 0.5, 5 i 20 $\mu$ M / AcN XYL: 0, 2.5, 10, 50 i 250 $\mu$ M / AcN	KT: 0, 0.05, 0.2, 1.25 i 5 mM / AcN KTA: 0, 5, 25, 75 i 375 $\mu$ M / DMSO BN: 0, 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5 $\mu$ M / AcN FEN: 0, 0.1, 0.5, 5 i 20 $\mu$ M / AcN XYL: 0, 2.5, 10, 50 i 250 $\mu$ M / AcN
Inhibidor específic / concentració ( $\mu$ M) / solvent	DDC / 50 / AcN	QN / 10 / AcN	NAF / 10 / DMSO
Inici de la reacció enzimàtica		$\beta$ -NADP	
Aturada de la reacció enzimàtica / volum ( $\mu$ l)	AcN / 100	AcN / 100	AcN / 100

G-6P-DH: glucosa -6-fosfat deshidrogenasa, TF: tampó fosfat sòdic 50 mM, Tris: tampó Tris.HCl 50mM

CZX: clorzoazona, DEX: dextrometorfà, ERO:etoxirosorufin

KT: ketoprofè, KTA: ketamina, BN: buprenorfina, FEN: fentanil, XYL: xilacina

DDC: dietilditiocarbamat, QN: quinidina, NAF:  $\alpha$ -naftoflavona

AcN:acetonitril, DMSO: dimetilsulfòxid

a: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac=0

b: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac era diferent de 0

c: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac(KT, KTA, BN i FEN)=0

d: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac(KT, KTA, BN i FEN) era diferent de 0

e: concentracions utilitzades pel Fàrmac XYL a totes les seves concentracions

f: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac(KT, BN, FEN i XYL)=0

g: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac(KT, BN, FEN i XYL) era diferent de 0

h: concentracions utilitzades pel Fàrmac KTA a totes les seves concentracions

## Mètodes

**Taula 7 Composició dels Incubats pels Estudis de Cinètica Enzimàtica (Concentració de Fàrmac Zero) i Estudis d'Inhibició (en Presència de Fàrmac). CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2.**

	Activitats CYP450 específiques	
	Pentoxiresorufina-O-dealquilasa CYP2B1/2	Testosterona-hidroxilasa CYPs 2A1/2, 2C, 2C11 i 3A1/2
<b>Condicions de l'incubació</b>		
Conc. proteïna microsomal (mg/ml)	0.5	0.5
Volum d'incubació (ml)	0.5	0.5
lots microsomes rata	008HRSDMC (KT) 010HRSDMC (FEN i XYL) 029HRSDMC (KTA i BN)	029HRSDMC (KT, KTA, BN, FEN, XYL)
temps d'incubació (min)	10	10
tampó d'incubació	Tris pH 7.8	TF pH 7.4
sistema generador de NADPH	G-6P-DH 2 U/ml, D-G-6P 4 mM i MgCl <sub>2</sub> 5 mM	
<b>Substrate específic / concentracions (µM) / solvent</b>	<b>PRO /</b> <sup>i</sup> : 2, 5, 10 i 50 <sup>j</sup> : 5, 10, 25 i 50 / DMSO	<b>TST /</b> <sup>k</sup> : 2.5, 10, 50 i 350 / DMSO
<b>Fàrmac: /concentracions (µM) / solvent</b>	<i>KT</i> : 0, 0.05, 0.2, 1.25 i 5 mM / AcN <i>KTA</i> : 0, 5, 25, 75 i 375 µM / DMSO <i>BN</i> : 0, 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5 µM / AcN <i>FEN</i> : 0, 0.1, 0.5, 5 i 20 µM / AcN <i>XYL</i> : 0, 2.5, 10, 50 i 250 µM / AcN	<i>KT</i> : 0, 0.05, 0.2, 1.25 i 5 mM / AcN <i>KTA</i> : 0, 5, 25, 75 i 375 µM / DMSO <i>BN</i> : 0, 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5 µM / AcN <i>FEN</i> : 0, 0.1, 0.5, 5 i 20 µM / AcN <i>XYL</i> : 0, 2.5, 10, 50 i 250 µM / AcN
Inhibidor específic / concentració (µM) / solvent	ORF / 200 / DMSO	SUL / 100 / Metanol CUM / 50 / Metanol CIM / 100 / Metanol TRO / 200 / Metanol
Inici de la reacció enzimàtica		β-NADP
Aturada de la reacció enzimàtica / volum (µl)	AcN / 100	TCA 10% / 480

G-6P-DH: glucosa -6-fosfat deshidrogenasa, TF: tampó fosfat sòdic 50 mM, Tris: tampó Tris.HCl 50mM

PRO: pentoxiresorufina, TST: testosterona

KT: ketoprofè, KTA: ketamina, BN: buprenorfina, FEN: fentanil, XYL: xilacina

ORF: orfenadrina, SUL: sulfafenazol, CUM: cumarina, CIM: cimetidina, TRO: troleandomicina

AcN:acetonitril, DMSO: dimetilsulfòxid, TCA 10%:àcid tricloroacètic al 10%

<sup>i</sup>: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac=0

<sup>j</sup>: concentracions utilitzades quan la concentració de Fàrmac era diferent de 0

<sup>k</sup>: concentracions utilitzades per tots els Fàrmacs i a totes les concentracions

## **5.6 Preparació de les Mostres per l'Anàlisi**

Els incubats generats en l'estudi d'inhibició es van transferir a tubs eppendorf i es van centrifugar a 25.000 xg durant 15 min a 4°C. Els sobrenedants es van diluir si corresponia amb el solvent pertinent a cada tècnica, i es van injectar directament al sistema per l'anàlisi cromatogràfic. Excepte, els incubats de la reacció específica de la TST, els quals van passar per una extracció en fase sòlida prèvia a l'anàlisi per HPLC.

## **5.7 Anàlisi per HPLC**

Les mostres es van analitzar per HPLC amb detecció UV o fluorescència segons es detalla a continuació.

Els mètodes d'anàlisi es van posar a punt de forma individual, per la detecció dels metabòlits específics de les diferents reaccions específiques. Malgrat que els mètodes no es van validar, si que es van preparar una sèrie de rectes per cada un, i es van determinar els paràmetres d'exactitud i precisió. Per les rectes, es van representar les concentracions teòriques de metabòlit CYP-específic *versus* els quocients de les àrees metabòlit específic/estàndard intern. Els valors dels quocients de les mostres es van interpolar d'aquesta recta per obtenir les concentracions de metabòlit específic (pmol/ml). A continuació, les concentracions de metabòlit específic es van dividir per la concentració de proteïna microsomal i pel temps d'incubació de les mostres. D'aquesta manera es va obtenir l'activitat enzimàtica (pmol/mg proteïna/min).

La Taula 8 i la Taula 9 mostren els components en la recta de calibració que s'utilitza per la quantificació del metabòlit específic en les mostres.

Així mateix, es van introduir una sèrie de controls en cada seqüència analítica de mostres per validar l'anàlisi de les mostres. Aquests controls estan descrits a la secció 5.5.



## *Mètodes*

Els paràmetres de les rectes i els valors de les mostres control no s'han inclòs en el present treball.

Taula 8 Components de les Rectes de Calibració per les Reaccions Específiques dels CYP2E1, CYP2D1 i CYP1A1/2.

	Activitats CYP450 específiques		
	Clorzoxazona-6 $\beta$ -hidroxilasa CYP2E1	Dextrometorfà-O-demetilasa CYP2D1	Etoxi-resorufina-O-deetilasa CYP1A1/2
<b>Recta de calibració</b>			
Metabòlit CYP-específic / concentracions (pmol/ml) / solvent	6- $\beta$ -hidroxiclorzoxazona / 500, 1000, 5000, 25.000 i 100.000 / AcN	Dextrorfà / 600, 1200, 3.000, 12.000 i 30.000 / TF pH 7.4	Resorufina / 10, 25, 50, 100, 500 i 2.000 / Tris pH 7.8
Estàndard intern / solvent	5-cloroxindol / AcN	Levalorfà / TF pH 7.4	4-metil-7-hidroxicumarina / AcN

TF: tampó fosfat sòdic 50 mM, Tris: tampó Tris.HCl 50mM

AcN: acetonitril

El volum de les mostres és el mateix que el de les incubacions de les reaccions específiques

Taula 9 Components de les Rectes de Calibració per les Reaccions Específiques dels CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2.

	Activitats CYP450 específiques	
	Pentoxiresorufina-O-dealquilasa CYP2B1/2	Testosterona-hidroxilasa CYPs 2A1/2, 2C, 2C11 i 3A1/2
<b>Recta de calibració</b>		
Metabòlit CYP-específic / concentracions (pmol/ml) / solvent	Resorufina / 10, 25, 50, 100, 500 i 2.000 / Tris pH 7.8	6- $\beta$ -hidroxitestosterona / 300, 500, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 i 20.000 pmol/ml / Metanol
Estàndard intern / solvent	4-metil-7-hidroxicumarina / AcN	Dexametasona / Metanol

TF: tampó fosfat sòdic 50 mM, Tris: tampó Tris.HCl 50mM

AcN: acetonitril

El volum de les mostres és el mateix que el de les incubacions de les reaccions específiques

## Mètodes

Els mètodes analítics desenvolupats en el present treball es descriuen a continuació:

### I. Determinació de la 6-hidroxiclorzoxazona

Columna : Supelcosil (LC-18DB) (150 x 4.6mm, 5µm, Supelco)

Temperatura de la columna: Temperatura ambient

Fase mòbil A: àcid acètic al 0.1%

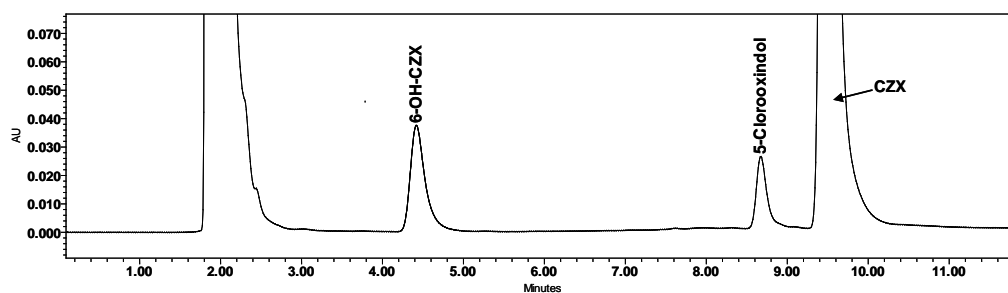
Fase mòbil B: metanol

Gradient:

Temps (min)	Fluxe (ml/min)	A%	B%	Curvatura
0	1	60	40	1
3.0	1	45	55	1
8.0	1	45	55	1
8.1	1	10	90	1
10.0	1	10	90	1
10.1	1	60	40	1

Longitud d'ona : 287 nm

**Figura 14** Cromatograma Representatiu de la Determinació de la 6-hidroxiclorzoxazona.



### II. Determinació del dextrorfà

Columna : Xterra RP18 (150 x 4.6mm, 5µm, Waters)

Temperatura de la columna: Temperatura ambient

Fase mòbil A: acetat amònic 50 mM pH 4.0.

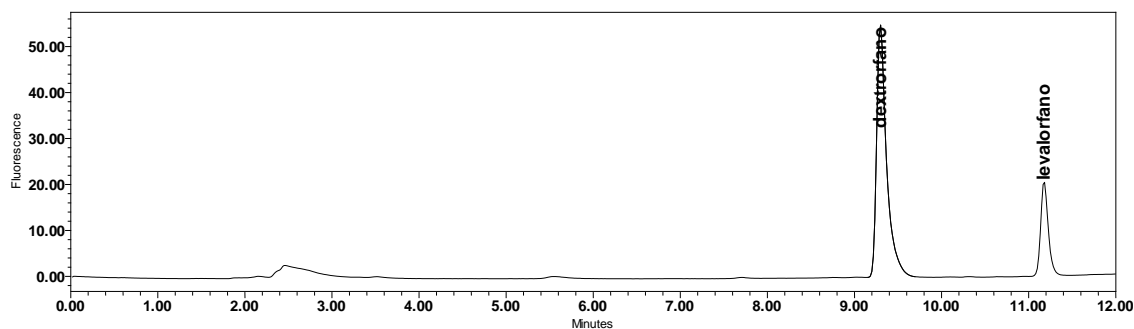
Fase mòbil B: acetonitril

Gradient:

Temps (min)	Fluxe (ml/min)	A%	B%	Curvatura
0	0.75	75	25	6
6.0	0.75	75	25	6
7.0	0.75	20	80	6
9.0	0.75	20	80	6
10.0	0.75	75	25	6

Longitud d'ona. Excitació: 235 nm. Emissió: 310 nm.

**Figura 15** Cromatograma Representatiu de la Determinació del Dextrorfà.



### III. Determinació de la resorufina

Columna : Symmetry C18 (150 x 4.6mm, 5 $\mu$ m, Waters)

Temperatura de la columna: Temperatura ambient

Fase mòbil A: acetat amònic 50 mM pH 6.0.

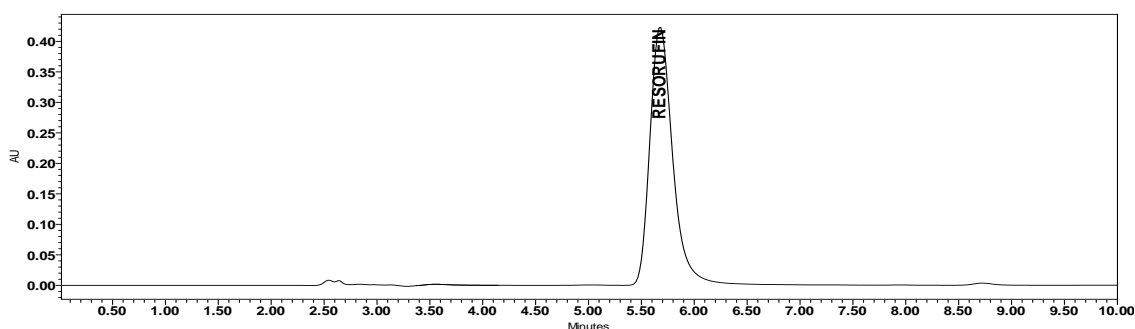
Fase mòbil B: metanol

Gradient:

Time (min)	fluxe (ml/min)	A%	B%	curvatura
0	1	55	45	6
6,0	1	55	45	6
7,0	1	10	90	6
10,0	1	10	90	6
11,0	1	55	45	6

Longitud d'ona: 570 nm

**Figura 16 Cromatograma Representatiu de la Determinació de la Resorufina.**



*IV. Determinació de les Hidroxitestosterones*

Columna: Symmetry 150x4.6mm 5µm, (Waters)

Temperatura de la columna: Temperatura ambient

Fase mòbil A: metanol : aigua (75:25) + àcid acètic al 0.1%

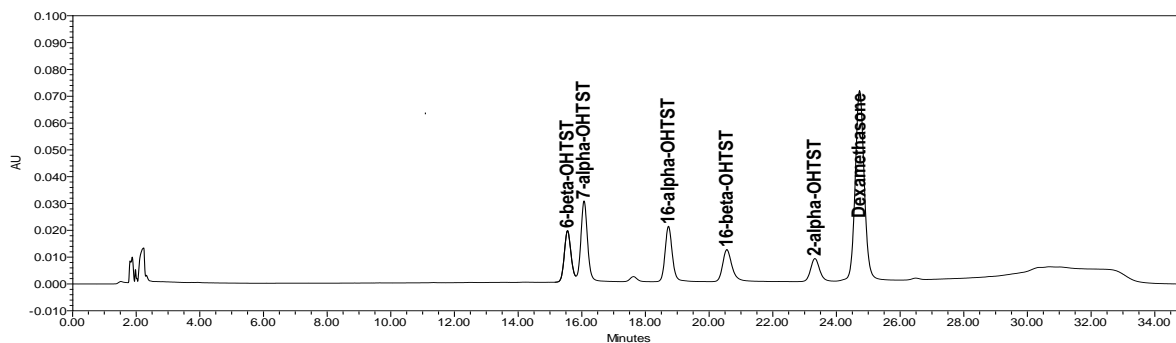
Fase mòbil B: metanol : acetonitril : aigua (64:6:30)+ àcid acètic al 0.1%

Gradient:

Time (min)	fluxe (ml/min)	A%	B%	curvatura
0	1	75	25	6
12,0	1	48	52	6
20,0	1	40	60	6
25,0	1	0	100	6
28,0	1	0	100	1
30,0	1	75	25	1

Longitud d'ona: 254 nm

Figura 17 Cromatograma Representatiu de la Determinació de les Hidroxitestosterones.



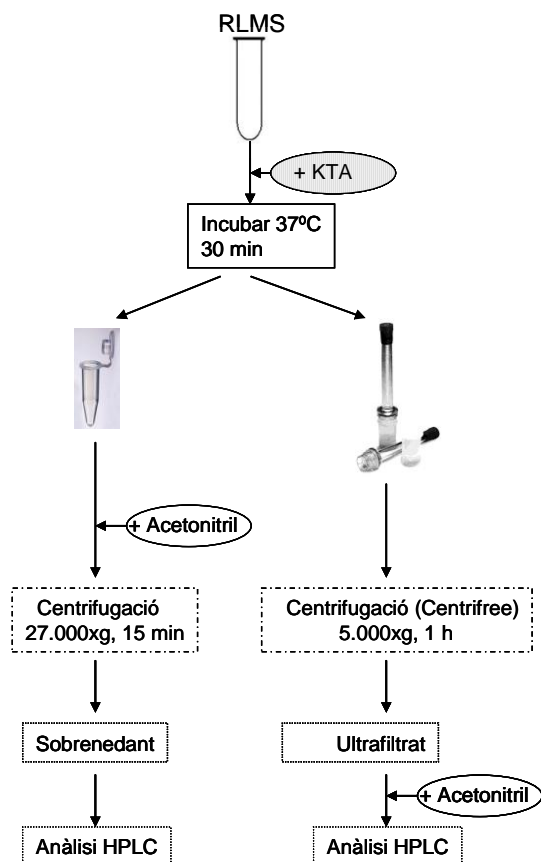
### 5.8 Determinació de la Unió de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model *In Vitro*

La unió no-específica de KTA a proteïnes microsomals es va avaluar quantificant la KTA no unida a RLM. La separació de KTA no unida es va realitzar per ultrafiltració a través d'una membrana YM-10.000, utilitzant el sistema *Centrifree Micropartition System* (Amicon).

Per aquest experiment, es van preparar incubacions de KTA en RLMS, a 37°C durant 30 min. Les incubacions es van fer per triplicat i a tres concentracions de KTA: 5, 25 i 100 pmol/ml, després es van preparar en dos grups de mostres (n=3). El disseny experimental es mostra a la Figura 18.

- Un primer grup (RLMS-A) al qual se li va afegir una quantitat d'AcN (proporcional a la quantitat que s'utilitza per aturar la reacció en una incubació), i es va col·locar en tubs eppendorf. A continuació, els tubs es van centrifugar a 27000 xg durant 15 min a 4°C, i els sobrenedants resultants es van analitzar.
- Un segon grup de mostres (RLMS-B) es va col·locar en el reservori de tubs *Centrifree* i aquests es van centrifugar durant 1 h a 5000 xg i 25°C. Es van obtenir els ultrafiltrats. Als ultrafiltrats es va afegir AcN proporcionalment, i finalment les mostres es van analitzar.

Figura 18 Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomal *In Vitro*.



RLMS : mostres que contenen microsomes hepàtics de rata (conc. prot. 1 mg/ml), solució tampó fosfat sòdic 100 mM pH 7.4, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, glucosa-6-fosfat i clorur de magnesi.  
KTA : ketamina.

Previ a aquest assaig es va determinar la recuperació analítica de la KTA i la unió d'aquesta al filtre del sistema d'ultrafiltració per poder aplicar els factors de correcció, tal i com s'explica a continuació a les seccions 5.8.1 i 5.8.2.

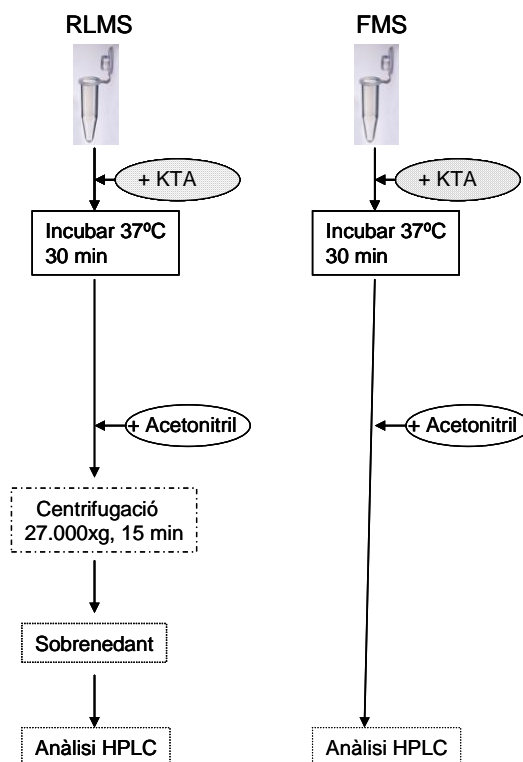
### 5.8.1 Determinació de la Recuperació Analítica

Les matrius RLMS i FMS es van incubar en presència de KTA en un bany amb agitació a 37°C durant 30 min, i es van aturar les reaccions afegint un volum d'AcN proporcional.

Les concentracions de KTA en els incubats van ser de 1, 5, 10, 50 i 100 pmol/ml, n=3.

Les mostres FMS es van analitzar directament en el sistema HPLC, i les mostres RLMS es van centrifugar a 27000 xg durant 15 min i després es van analitzar. La Figura 19 mostra el disseny experimental.

**Figura 19 Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomal In Vitro: Determinació de la Recuperació Analítica de la KTA.**



RLMS : mostres que contenen microsomes hepàtics de rata (conc. prot. 1 mg/ml), solució tampó fosfat sòdic 100 mM pH 7.4, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, glucosa-6-fosfat i clorur de magnesi.  
 FMS : mostres RLMS filtrades en Centrifree YM-10 a 5000 xg, 1 h a 25°C.  
 KTA : ketamina.

### 5.8.2 Determinació del Percentatge d'Unió de la KTA al Filtre del Sistema d'Ultrafiltració

Les mostres de FMS es van incubar en presència de KTA a les concentracions de 5, 25 i 100 pmol/ml, n=3:

- A un conjunt de mostres FMS (FMS-A) se li va afegir el volum d'AcN proporcional, es van centrifugar a 27000 xg durant 15 min i per acabar es van analitzar.

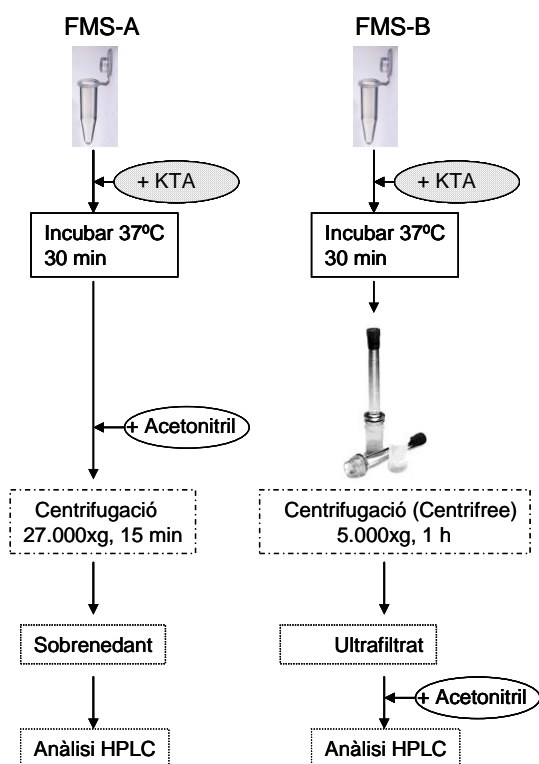


## Mètodes

- Un segon conjunt de mostres (FMS-B) es van centrifugar en tubs *Centrifree* a 5000 xg durant 1 h. Posteriorment, es va afegir un volum d'AcN al sobrenedant de les mostres FMS-B i després es van analitzar.

La Figura 20 mostra el disseny experimental.

**Figura 20** Determinació de la Unió No-Específica a Proteïnes Microsomal *In Vitro*: Determinació de la Unió de la KTA al Filtre.



FMS : mostres RLMS filtrades en *Centrifree* YM-10 a 5000 xg, 1 h a 25°C.

RLMS : mostres que contenen microsomes hepàtics de rata (conc. prot. 1 mg/ml), solució tampó fosfat sòdic 100 mM pH 7.4, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, glucosa-6-fosfat i clorur de magnesi.

KTA : ketamina.

## **6 TRACTAMENT DE LES DADES**

### **6.1 Caracterització dels Lots de RLM**

#### **6.1.1 *Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal***

Seguint el protocol del “Total Protein Kit” de Sigma. El mètode que descriu aquest protocol és el mètode clàssic de quantificació de proteïnes de Lowry però lleugerament modificat per simplificar i fer la reacció més estable. El procediment es divideix en dos etapes, tal i com es descriu a la secció 5.2.1.

Per tractar les dades, es va incloure en l'experiment una recta de calibració a concentracions conegudes d'albumina, que es va preparar seguint les instruccions del Kit comercial. D'aquesta recta es van interpolar els valors d'absorció de les mostres i es van obtenir els valors de concentració (mg/ml).

Una vegada determinada la concentració es va ajustar a una concentració de 20 mg/ml i es va etiquetar i emmagatzemar a -80°C.

#### **6.1.2 *Determinació del CYP450 en RLM***

Es va determinar la diferència entre la mitjana dels valors d'absorció corresponents a les regions de l'espectre a 449, 450 i 451 nm, i a 489, 490 i 491 nm per les dues solucions de 0.25 i 1 mg de proteïna microsomal/ml. El càlcul es va fer aplicant la fórmula deduïda a partir de l'increment d'absorció entre 450 i 490 nm obtinguda de l'espectrofotòmetre, i aplicant el coeficient d'extinció molar del complex CYP450 reduït-CO ( $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), Equació 1.

$$CONC = \frac{(\Delta_{450-490} \cdot 1000)}{91 \cdot CP} \quad \text{Equació 1}$$

on,

*CONC*, és la concentració específica de CYP450 expressada en nmol de CYP450 per mg de proteïna microsomal.

*CP*, concentració de proteïnes en la mostra de microsomes analitzada (en mg/ml).

### **6.1.3 Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM**

Es va calcular l'activitat enzimàtica total per cada replicat seguint la fórmula, deduïda a partir de l'increment de l'absorció per min (*D*) obtingut de l'espectrofotòmetre, i aplicant el coeficient d'extinció molar del Citocrom C reduït ( $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ):

$$AE = \frac{D \cdot 250000}{21} \quad \text{Equació 2}$$

on,

*AE*, és l'activitat enzimàtica expressada en nmol del Citocrom C reduït per min i per mg de proteïna microsomal.

*D*, és l'increment d'absorció per min.

## **6.2 Cinètiques Enzimàtiques**

### **6.2.1 Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP450-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal**

Les equacions de regressió lineal (Equacions 3 i 4) es va ajustar a les representacions de les concentracions de proteïna microsomal i els temps d'incubació *versus* l'activitat (pmol/ml).

(I). Linealitat en funció de la concentració de proteïna microsomal:

$$y = ax + b \quad \text{Equació 3}$$

on, *x* és la concentració de proteïna microsomal, i *y* és la formació de metabòlit (pmol/ml) obtinguda en funció de la concentració de proteïna; *a* i *b* són constants de l'equació (el pendent i la intersecció, respectivament).

(II). Linealitat en funció del temps:

$$y = ax + b \text{ Equació 4}$$

on,  $x$  és el temps d'incubació, i  $y$  és la formació de metabòlit (pmol/ml) obtinguda en funció del temps;  $a$  i  $b$  són constants de l'equació (el pendent i la intersecció, respectivament).

### 6.2.2 Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics $V_{max}$ i $K_m$

Els resultats d'activitat enzimàtica que es van obtenir després de la incubació dels microsomes a diferents concentracions de substrate específic (veure secció 5.4.2), van donar lloc a una corba hiperbòlica (quan era una cinètica de M-M), o sigmoïdal (quan era una cinètica de Hill).

Els paràmetres enzimàtics  $K_m$  i  $V_{max}$  es van determinar ajustant dos models a les dades obtingudes: el model de M-M (Equació 5) i el model de Hill o model Sigmoïdal (Equació 6). El model de M-M representa la cinètica enzimàtica típica, que normalment es fa servir per estudiar les propietats cinètiques dels enzims. El model de Hill descriu la una cinètica d'autoactivació, a on a partir d'una concentració determinada del mateix substrate es produeix un increment exponencial en l'activitat de l'enzim.

**Figura 21 Representació Gràfica de l'Equació de Michaelis-Menten (M-M). Obtenció dels Paràmetres  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) i  $V_{max}$  (pmol/mg proteïna/min)**

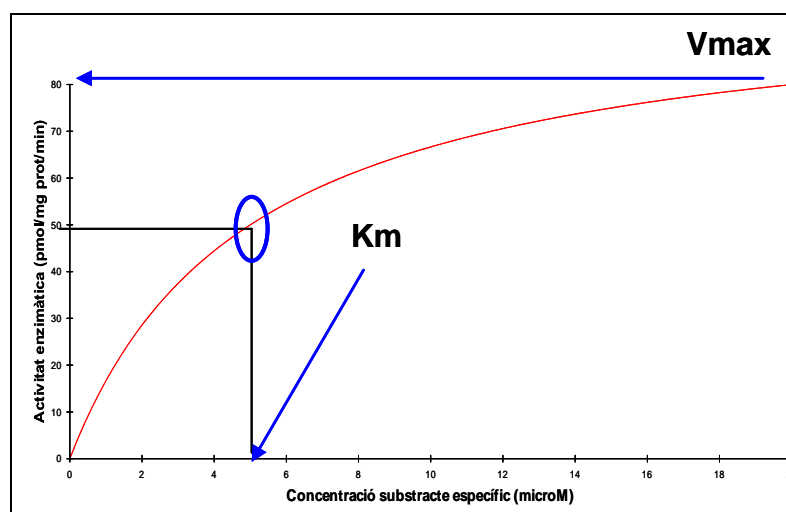
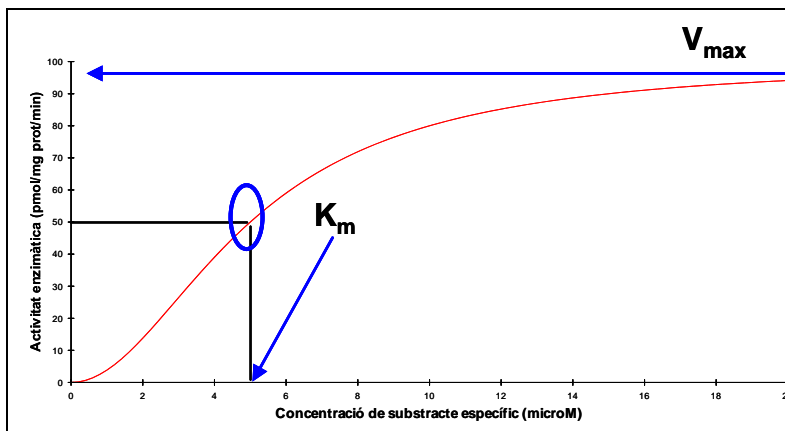


Figura 22 Representació Gràfica de l'Equació de Hill. Obtenció dels Paràmetres

$K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) i  $V_{\max}$  (pmol/mg proteïna/min)



Les Equacions 5 i 6 es van ajustar a l'activitat enzimàtica (pmol/mg proteïna microsomal/min) de cada CYP450, mitjançant una regressió no-lineal simultània (SNLR) utilitzant el software WinNonlin:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equació 5}$$

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]^{\gamma}}{K_m + [S]^{\gamma}} \quad \text{Equació 6}$$

on,

$v$  i  $V_{\max}$  són respectivament les velocitats observada i màxima de metabolisme (pmol/mg proteïna microsomal/min),  $K_m$  és la constant de Michaelis-Menten,  $[S]$  és la concentració de substrate específic, i  $\gamma$  és el factor de sigmoidicitat.

(ref. 92, ref. 93)

### 6.3 Estudi *In Vitro* d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN

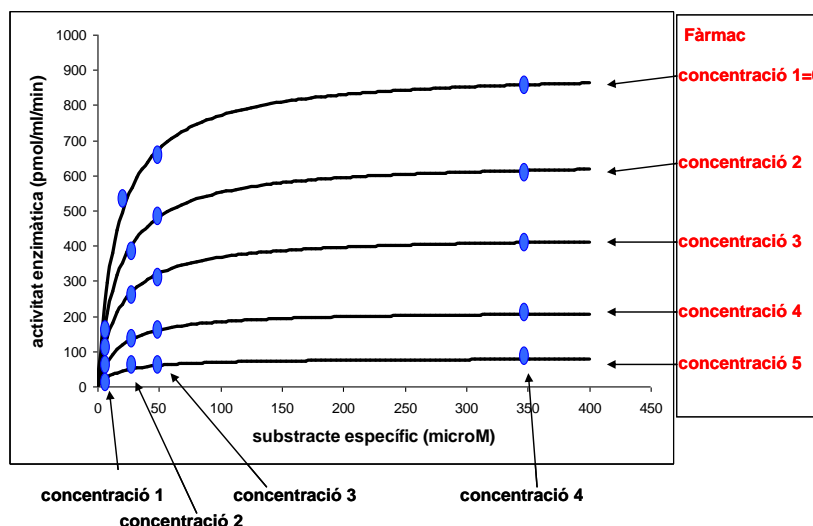
#### 6.3.1 Determinació de la $K_{m,app}$ i Càlcul del Quocient $K_{m,app}/V_{max,app}$

Per cada concentració de fàrmac es van estimar els paràmetres  $K_m$  i  $V_{max}$  després d'ajustar el model de M-M als valors d'activitat enzimàtica (pmol/mg proteïna/min). Quan es fan ajustaments cinètics on la concentració de fàrmac és diferent de zero, els paràmetres s'anomenen  $K_{m,app}$  i  $V_{max,app}$  (Equació 7).

$$v = \frac{V_{max,app} \cdot [S]}{K_{m,app} + [S]} \quad \text{Equació 7}$$

on,  $v$  i  $V_{max,app}$  són respectivament les velocitats observada i màxima aparent de metabolisme (pmol/mg proteïna microsomal/min);  $K_{m,app}$  és la constant aparent de M-M; i  $[S]$  és la concentració de substrate específic ( $\mu\text{M}$ ).

**Figura 23 Representació Teòrica de l'Ajustament de M-M a les Activitats Enzimàtiques per una Reacció Específica (Una Isoforma CYP450) en l'Experiment d'Inhibició d'un Fàrmac.**



Es van estimar els valors de  $K_m$  i  $V_{max}$  per a cada isoforma CYP450 i cada concentració de fàrmac, i amb aquestes estimacions es van calcular els quocients  $K_{m,app}/V_{max,app}$  de forma individual. Els quocients  $K_{m,app}/V_{max,app}$  es van comparar

entre les diferents concentracions de fàrmac amb un test estadístic. El test es va realitzar de forma individual per cada isoforma (o reacció específica).

La selecció del tipus de test estadístic es va fer analitzant la distribució dels valors mitjos dels quocients  $K_{m,app}/V_{max,app}$ . Quan la distribució de les dades era normal s'aplicava un test estadístic paramètric: *anàlisi de la variància d'una via*. Quan els valors no presentaven una distribució normal, s'aplicava un test estadístic no paramètric: test de Kruskal-Wallis.

Aquest estudi estadístic va permetre diferenciar els fàrmacs que podien interferir en l'activitat d'una isoforma CYP450.

### 6.3.2 Càlcul de l'IC<sub>50</sub>

Es va determinar el valor de l'IC<sub>50</sub> de les relacions fàrmac-isoforma CYP450 que en el test estadístic havien donat diferències estadísticament significatives i per tant, amb possibilitat d'interaccions.

Per això, les dades d'activitats enzimàtiques obtingudes dels incubats de RLM, que es van realitzar a una concentració determinada de substrate específic i en presència de diferents concentracions de fàrmac, es van expressar com a percentatge de la activitat control (concentració zero de fàrmac). Els valors de concentració de fàrmac *versus* els percentatges d'activitat, van ser ajustaments per la funció hiperbòlica que descriu l'Equació 8 utilitzant el software SigmaPlot.

$$v = V_0 \cdot \left[ 1 - \left( \frac{C^\gamma}{C^\gamma + IC_{50}^\gamma} \right) \right] \quad \text{Equació 8}$$

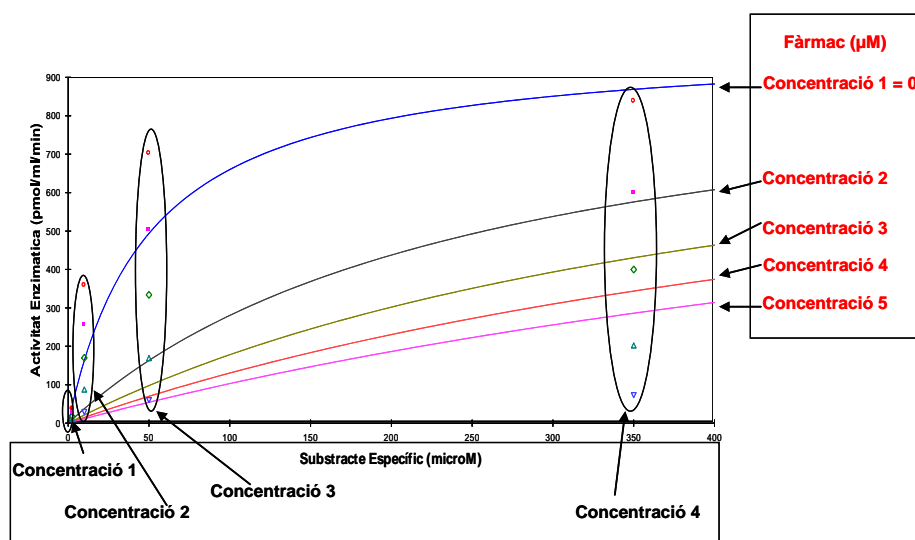
on,  $v$  és l'activitat enzimàtica (pmol/mg proteïna microsomal/min),  $V_0$  és l'activitat enzimàtica en absència del fàrmac (pmol/mg proteïna microsomal/min),  $C$  és la concentració del fàrmac ( $\mu\text{M}$ ),  $IC_{50}$  és la concentració del fàrmac que inhibeix l'activitat màxima d'un enzim a la meitat ( $\mu\text{M}$ ), i  $\gamma$  és el factor de sigmoidicitat.

6.3.3 Càlcul de la  $K_i$ . Mètode de Regressió No-Lineal Simultània, SNLR. Equacions derivades de M-M

Es van ajustar les set fórmules d'inhibició que es descriuen en aquesta secció a les dades experimentals d'activitat enzimàtica, i es va seleccionar el model que millor ajustava segons els criteris que es descriuen a continuació. El model indicava el tipus d'inhibició i aportava el valor de  $K_i$ . La  $K_i$  es va estimar per aquelles associacions fàrmac-CYP450 en les que s'havien detectat possibles interaccions d'inhibició després de l'estudi estadístic que es detalla a la secció anterior 6.3.1.

Per això, les següents equacions d'inhibició deduïdes de les equacions de M-M i de Hill (secció 6.3.4), es van ajustar als valors d'activitat enzimàtica de cada reacció CYP450-específica, mitjançant SNLR i utilitzant el software WinNonlin. La Figura 24 mostra una representació de l'ajustament teòric d'un model d'inhibició (en aquest cas competitiu) mitjançant el WinNonlin. A la Figura s'observen representats els valors d'activitat enzimàtica a quatre concentracions de substrate específic, i tot això per les cinc concentracions de fàrmac (inclosa la concentració zero).

Figura 24 Representació Teòrica d'un Model d'Inhibició Mitjançant Regressions No-Lineals Simultànies (SNLR) Utilitzant WinNonlin



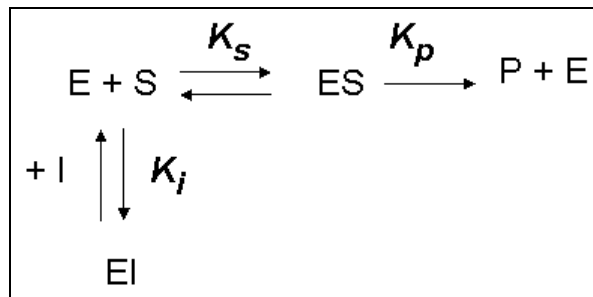
Les quatre equacions deduïdes del model cinètic de M-M són les següents:



6.3.3.1 Inhibició Competitiva Simple

Es dona quan el substracte i l'inhibidor competeixen pel mateix centre actiu de l'enzim. El valor de la  $K_m$  varia mentre que el valor de la  $V_{max}$  es manté constant.

Figura 25 Esquema Inhibició Competitiva Simple



$E$ :enzim;  $S$ :substracte;  $ES$ :complexe enzim-substrate;  $I$ :inhibidor;  $EI$ :complexe enzim-inhibidor;  $P$ :producte;  $E_t$ :enzim total;  $K_s$ :constant de formació del complexe enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu M$ );  $K_p$ :constant de formació de producte;  $K_i$ :constant de formació del complexe  $EI$  o constant d'inhibició.

Tenint en compte que,

$$V = K_p \cdot [ES] \quad (1)$$

Quan  $V = V_{max}$ ,  $[ES] = [E_t]$  i,

$$V_{max} = K_p \cdot [E_t] \quad (2)$$

A més,

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_s} \quad (3)$$

$$[EI] = \frac{[E] \cdot [I]}{K_i} \quad (4)$$

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{K_p \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{K_s \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

finalment,

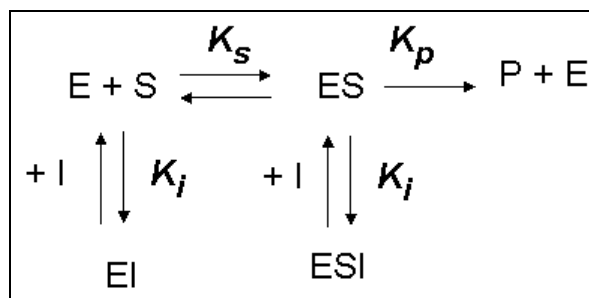
$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S]}{K_s}\right)} \quad \text{Equació 9}$$

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substracte ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant de formació del complexe enzim-substracte o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ ).

### 6.3.3.2 Inhibició No Competitiva Simple

Es dona quan el substracte i l'inhibidor s'uneixen a centres independents de l'enzim i es forma el complexe ESI, que no és eficaç per la catàlisi. És un tipus d'inhibició que no es dona freqüentment. El valor de  $V_{\max}$  queda afectat, però el de  $K_m$  es manté inalterat.

Figura 26 Esquema Inhibició No Competitiva Simple



## Tractament de les Dades

$E$ :enzim;  $S$ :substrate;  $ES$ :complexe enzim-substrate;  $I$ :inhibidor;  $EI$ :complexe enzim-inhibidor;  $EIS$ :complexe enzim-inhibidor-substrate;  $P$ :producte;  $E_t$ :enzim total;  $K_s$ :constant de formació del complexe enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten;  $K_p$ :constant de formació de producte;  $K_i$ :constant de formació del complexe  $EI$  i  $ESI$  o constant d'inhibició.

Tenint en compte (1), (2), (3), (4) i

$$[ESI] = \frac{[E] \cdot [S] \cdot [I]}{K_i \cdot K_s} \quad (5)$$

llavors,

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{K_p \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S] \cdot [I]}{K_i \cdot K_s} \right)}$$

$$v = \frac{[S] \cdot V_{\max}}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad \text{Equació 10}$$

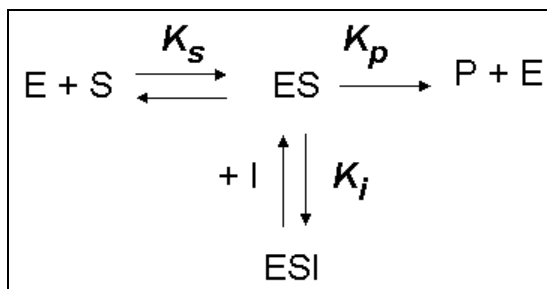
$v$ :velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ :velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ :concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ :concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ :constant de formació del complexe enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ :constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ ).

### 6.3.3.3 Inhibició Acompetitiva Simple

Es dona quan l'inhibidor s'uneix a l'enzim només quan aquest ja està unit al substrate.

Els valors de  $V_{\max}$  i  $K_m$  disminueixen. Normalment en aquests casos el substracte i l'inhibidor tenen una estructura molt semblant.

Figura 27 Esquema Inhibició Acompetitiva Simple



*E*:enzim; *S*:substracte; *ES*:complexe enzim-substrate; *I*:inhibidor; *EIS*:complexe enzim-inhibidor-substrate; *P*:producte;  $E_t$ :enzim total;  $K_s$ :constant de formació del complexe enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_p$ :constant de formació de producte;  $K_i$ :constant de formació del complexe *ESI* o constant d'inhibició.

Tenint en compte (1), (2), (3), (5), i

$$[E_t] = [E] + [ES] + [ESI]$$

llavors,

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{K_p \cdot [S]}{[E] + [ES] + [ESI]}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S] \cdot [I]}{K_s \cdot K_i} \right)}$$

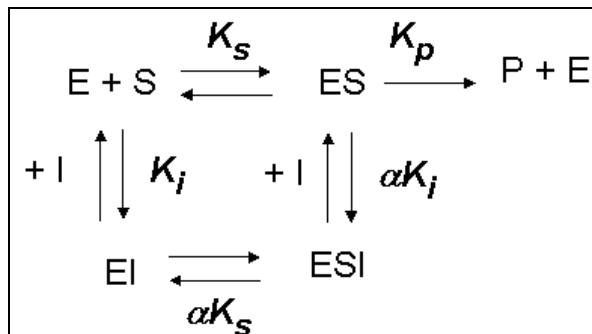
$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Equació 11}$$

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant de formació del complex enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ ).

#### 6.3.3.4 Inhibició Mixta

Aquest tipus d'inhibició engloba una barreja entre la inhibició acompetitiva i la no competitiva, i les unions de l'inhibidor i del substrate a l'enzim no s'exclouen mútuament. Normalment l'efecte de l'inhibidor altera la  $V_{\max}$  i la  $K_m$ .

Figura 28 Esquema Inhibició Mixta



$E$ : enzim;  $S$ : substrate;  $ES$ : complex enzim-substrate;  $I$ : inhibidor;  $EI$ : complex enzim-inhibidor;  $EIS$ : complex enzim-inhibidor-substrate;  $P$ : producte;  $E_t$ : enzim total;  $K_s$ : constant de formació del complex enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_p$ : constant de formació de producte;  $K_i$ : constant de formació del complex  $EI$  i  $ESI$  o constant d'inhibició;  $\alpha$ : constant que relaciona  $K_s$  i  $K_i$ .

Tenint en compte (1), (2), (3), (4),

$$[ESI] = \frac{[E] \cdot [S] \cdot [I]}{\alpha \cdot K_i \cdot K_s} \quad i,$$

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

llavors,

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{K_p \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I] \cdot [S]}{\alpha \cdot K_s \cdot K_i} \right)}$$

$$v = \frac{[S] \cdot V_{\max}}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_i} \right)}$$

Equació 12

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant de formació del complex enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ );  $\alpha$ : constant que relaciona  $K_s$  i  $K_i$ .

#### 6.3.4 *Fòrmules d'Inhibició Reversible Sigmoidal*

Una part important del treball va consistir en desenvolupar una sèrie d'equacions per considerar les inhibicions competitiva, no competitiva i acompetitiva per cinètiques enzimàtiques deduïdes de l'equació de Hill, que no estaven descrites en bibliografia. Les equacions es van programar en el software WinNonlin i es van ajustar a les dades d'activitat (velocitat enzimàtica).

A continuació es descriuen les equacions.

##### 6.3.4.1 *Inhibició Competitiva Sigmoidal*

L'esquema és el mateix que descriu la inhibició competitiva simple (secció 6.3.3.1) però, considerant  $n$ , que és el número de centres d'unió que hi ha en una molécula d'enzim per un S.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{K_s^n \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + [S]^n\right)}$$

**Equació 13**

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant de formació del complex enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ );  $n$ : número de Hill.

#### 6.3.4.2 Inhibició No Competitiva Sigmoidal

L'esquema és el mateix que descriu la inhibició no competitiva simple (secció 6.3.3.2) però, considerant  $n$ .

$$v = \frac{[S]^n \cdot V_{\max}}{K_s^n \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]^n \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

**Equació 14**

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant de formació del complex enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten,  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ );  $n$ : número de Hill.

#### 6.3.4.3 Inhibició Acompetitiva Sigmoidal

L'esquema és el mateix que descriu la inhibició acompetitiva simple (secció 6.3.3.3) però, considerant  $n$ .

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{K_s^n + [S]^n \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

**Equació 15**

$v$ : velocitat (pmol/mg proteïna/min);  $V_{\max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min);  $[S]$ : concentració de substrate ( $\mu\text{M}$ );  $[I]$ : concentració d'inhibidor ( $\mu\text{M}$ ),  $K_s$ : constant

de formació del complexe enzim-substrate o constant de Michaelis-Menten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ );  $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ );  $n$ : número de Hill.

Una vegada ajustades les dades, es va seleccionar el model d'inhibició que millor ajustava a les dades d'acord amb : a) L'evolució de  $K_m$  i  $V_{\max}$  a cada concentració d'inhibidor, b) els criteris estadístics d'Akaike (AIC) i de Schwartz (SBC), c) el coeficient de variació (CV%) en l'estimació dels paràmetres.

### **6.3.5 Càlcul de la $K_i$ . “Mètode de $K_{m,app}$ ”**

És un mètode que permet estimar el valor de  $K_i$  a partir de la representació de les concentracions de fàrmac *versus* els valors del quocient  $K_m/V_{\max}$  (calculats en la secció 6.3.1). A continuació, una regressió lineal simple es va ajustar als valors dels quocients.

El valor de  $K_i$  es va obtenir de la intersecció en l'eix de les  $x$ , quan  $y=0$ .

(ref. 94, ref. 95)

### **6.3.6 Càlcul de la $K_i$ “ $IC_{50}$ -to- $K_i$ Converter”**

Aquest mètode és una nova eina que existeix a internet i que permet estimar els valors de  $K_i$  a partir dels valors experimentals d' $IC_{50}$ , per inhibidors d'enzims que segueixen una cinètica de M-M. La pàgina web calcula els valors de  $K_i$  pels tres tipus d'inhibició simple (competitiva, no competitiva i acompetitiva) considerant el fàrmac com la molècula que s'uneix a l'enzim amb un tipus d'inhibició reversible “clàssica”, o també considerant el fàrmac com un inhibidor d'unió “forta” (“*tight binding inhibitor*”). Pel càlcul en el cas d'inhibició “clàssica”, el programa utilitza el valor de la concentració de substrate específic utilitzada en l'estimació de la  $IC_{50}$ , el valor de la  $IC_{50}$ , i el valor de la  $K_m$ . El càlcul en el cas d'inhibició “tight binding”, s'utilitza també el valor de la concentració de l'enzim. En el present treball s'utilitza el càlcul d'inhibició reversible “clàssica”.



El mètode es va crear amb la idea d'obtenir el valor de la  $K_i$  simplificant el número d'experiments, i d'aportar informació a l'investigador de forma ràpida per dirigir l'estudi d'un nou fàrmac. Per aplicar-lo, s'assumeix que el substrate i l'inhibidor s'uneixen de forma reversible a l'enzim, i que no hi ha una unió múltiple de molècules d'inhibidor a l'enzim, ni cooperativitat o mecanismes complexos d'inhibició, com les inhibicions mixtes o parcials.

(ref. 96)

#### **6.4 Determinació de la Unió No-Específica del KT, la KTA, la BN, el FEN i la XYL a Proteïnes Microsomals**

##### **6.4.1 Determinació de la Unió de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model In Vitro**

La unió no-específica dels fàrmacs a proteïnes microsomals es va estudiar *in vitro* en el cas de la KTA.

###### **6.4.1.1 Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R)**

El %R de la metodologia analítica deguda a la precipitació de les proteïnes durant la preparació de la mostra es calcula com s'indica a continuació:

$$\%R = \frac{R_{RLMS}}{R_{FMS}} \cdot 100 \quad \text{Equació 16}$$

on,

$R_{RLMS}$  = mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en RLMS

$R_{FMS}$  = mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en FMS

###### **6.4.1.2 Càlcul del Percentatge de KTA Unida (%M)**

El percentatge de KTA unida (%M) al material d'ultrafiltració (tubs Centrifree) es calcula amb la següent equació:

$$\%M = \frac{M_B}{M_A} \cdot 100 \quad \text{Equació 17}$$

on,

$M_A$ = mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en FMS-A

$M_B$ = mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en FMS-B

#### 6.4.1.3 Càlcul del Percentatge del KTA Unida (%B) i No Unida (%F)

Els percentatges de KTA unida (%B) i no unida (%F) a les proteïnes microsomals es va obtenir seguint la següent equació:

$$\%F = \frac{C_{RLMS-B} \cdot \%R}{C_{RLMS-A} \cdot \%M} \cdot 100 \quad \text{Equació 18}$$

$$\%B = 100 \cdot \%F$$

$C_{RLMS-A}$ = concentració (pmol/ml) mitjana (n=3) en el grup de mostres de RLMS-A

$C_{RLMS-B}$ = concentració (pmol/ml) mitjana (n=3) en el grup de mostres de RLMS-B

En aquest cas, tant per  $C_{RLMS-A}$  com per  $C_{RLMS-B}$ , la KTA es va quantificar interpolant el valor de l'àrea de pic en una corba de calibració lineal (regressió lineal).

#### 6.4.2 *Predicció de la Unió No-Específica a les Proteïnes Microsomals Utilitzant les Propietats Físico-Químiques del KT, la KTA, el BN, el FEN i la XYL. Models In Silico*

La determinació *in silico* de la unió a proteïnes microsomals d'un fàrmac a partir de les seves propietats físico-químiques es va fer d'acord amb mètodes descrits bibliogràficament. El models que s'apliquen són una sèrie d'equacions que tenen en

compte principalment la lipofília de la molècula ( $\log P$ ) i el seu estat d'ionització o càrrega.

Per aplicar els següents models, primer es van classificar les molècules en tres grups segons la seva càrrega: àcida, bàsica o neutra, i després es va assumir que: la unió a proteïnes microsomals era no-específica, que els valors de  $f_{u,mic}$  s'ajustaven a una concentració de proteïna microsomal de 1 mg/ml, i que la unió a proteïnes microsomals per un mateix fàrmac era independent de l'espècie animal.

Aquest model presenta l'avantatge que no necessita una part experimental.

Els models per la determinació *in silico* de  $f_{u,mic}$  són els que es descriuen les següents equacions:

- El model d'Austin, més apropiat per molècules àcides:

tenint en compte que,

$$\log\left(\frac{(1-f_{u,mic})}{f_{u,mic}}\right) = 0.53 \bullet \log D_{7.4} - 1.42$$

llavors,

$$f_{u,mic} = \frac{1}{10^{(0.53 \bullet \log D_{7.4} - 1.42)} + 1} \quad \text{Equació 19}$$

- El model de Hallifax, més apropiat per les molècules bàsiques:

$$f_{u,mic} = \frac{1}{10^{(0.072 \bullet \log P + 0.067 \bullet \log P - 1.126)} + 1} \quad \text{Equació 20}$$

- El model combinat:

$$f_{u,mic} = \frac{1}{C \cdot 10^{(0.56 \cdot \log P / D - 1.41)} + 1} \quad \text{Equació 21}$$

a on el  $\log P/D$  és el valor de  $\log D_{7.4}$  en molècules àcides, i el valor de  $\log P$  en molècules bàsiques. Això és degut a què l'afinitat als fosfolípids de membrana a  $\text{pH}_{7.4}$  per part de les molècules bàsiques es descriu millor pel valor de  $\log P$  que pel valor de  $\log D_{7.4}$ , i a l'inversa per les molècules àcides.  $C$  és la concentració de proteïna microsomal.

- El model de Simcyp® per:

- molècules àcides:

$$f_{u,mic} = \frac{1}{10^{(0.2 \cdot \log P - 1.54)} + 1} \quad \text{Equació 22}$$

- molècules bàsiques:

$$f_{u,mic} = \frac{1}{10^{(0.58 \cdot \log P - 2.02)} + 1} \quad \text{Equació 23}$$

(ref. 98, ref. 99, ref. 100, ref. 101, ref. 102, ref. 103)

Els valors de  $f_{u,mic}$  obtinguts pels dos mètodes, es van multiplicar pel valor de  $K_i$  i es va obtenir el valor de  $K_i$  no unida.

## 6.5 Càlcul de la $K_i$ Modificada per la $f_{u,mic}$

Per obtenir els valors de  $K_i$  no unida es van multiplicar els valors de  $K_i$  pel factor  $f_{u,mic}$ .

Aquest càlcul es va aplicar a aquelles relacions fàrmac-CYP450 on es va detectar una interacció potencial per inhibició en la secció 7.3.1.

## 6.6 Càlcul de $R_{exp}$

El quocient  $R_{exp}$  és el valor que es calcula tenint en compte el paràmetre d'inhibició  $K_i$  i la concentració màxima d'inhibidor assolida *in vivo*. És un valor de “cutoff” publicat a la directriu d'interaccions en el metabolisme de fàrmacs en humans de la FDA (ref. 114).

Quan el  $R_{exp}$  és  $>1.1$  la directriu indica que s'ha de considerar el fàrmac com a potencial inhibidor d'una isoforma CYP450, i per tant, iniciar un estudi per examinar aquesta inhibició.

El càlcul del quocient es realitza segons la següent equació:

$$R_{exp} = 1 + \frac{[I_{max}]}{K_i^u} \quad \text{Equació 24}$$

a on,

$R_{exp}$ , és la relació de les àrees sota la corba en plasma en presència i en absència d'inhibidor.

$[I_{max}]$  és la concentració màxima de fàrmac en plasma ( $\mu\text{M}$ ).

i  $K_i^u$  és la constant d'inhibició no unida a proteïnes microsomals ( $\mu\text{M}$ ).

(ref. 114)

## 7 RESULTATS

### 7.1 Caracterització Funcional dels Lots de RLM

#### 7.1.1 *Determinació de la Concentració de Proteïna Microsomal*

La Taula 10 mostra els valors de concentració de proteïna en RLM obtinguts per les tècniques de precipitació amb calci i d'ultracentrifugació. S'observa que la quantitat de proteïna per ml obtinguda amb el mètode d'ultracentrifugació és aproximadament 10 vegades més gran que amb el mètode de precipitació amb calci i el rendiment és major.

Aquests microsomes es van obtenir del fetge de rates no tractades amb fàrmac, i les determinacions es van fer per duplicat en cada lot.

**Taula 10 Lot , Mètode de Preparació dels Microsomes, i Concentració de Proteïna Microsomal en els RLM Obtinguts**

Data Preparació	Lot	Teixit	Mètode Preparació	Volumen (ml) soluc. Microso.	Conc. Proteïna Inicial (mg/ml)	Proteïna Total (mg)	Conc. Proteïna Final (mg/ml)
27/04/2000	008HRSDMC	Fetge	Ca++	46,49	10,81	502,56	10
09/02/2001	009HRSDMC		Ca++	57,63	7,67	442,02	5
24/10/2001	010HRSDMC		Ca++	70,82	11,89	842,05	10
12/07/2007	029HRSDMC		ULTRA_C	17,07	95,63	1632,59	20

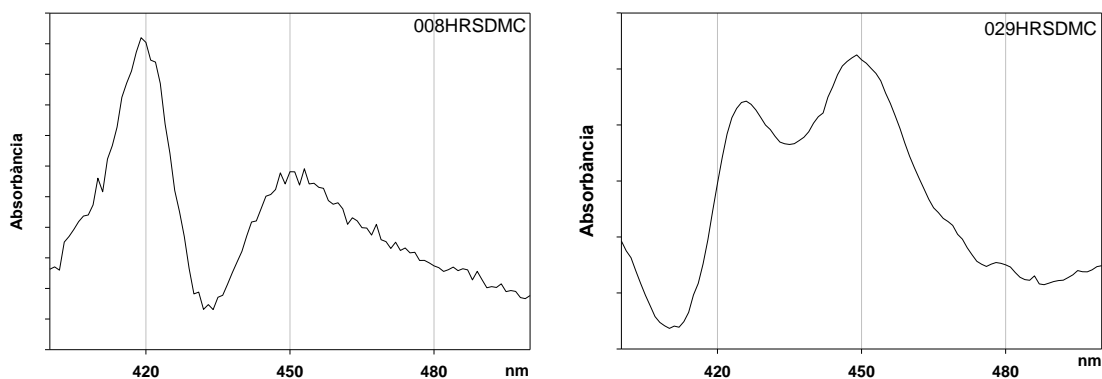
Ca++ : Precipitació amb Calci

ULTRA\_C: Ultracentrifugació

#### 7.1.2 *Determinació del Citocrom P450 en RLM*

La Figura 29 mostra els espectres d'absorció ultravioleta del CYP450 en dos lots de RLM. El lot 008HRSDMC correspon a microsomes obtinguts amb el mètode de precipitació amb calci. El lot 029HRSDMC correspon a microsomes obtinguts per ultracentrifugació. En ambdós lots, les mostres per l'anàlisi es van preparar a una concentració de 1 mg/ml en Tris.HCl 50 mM pH 7.4 : glicerol (80:20).

Figura 29 Espectre d'Absorció del CYP450



La Taula 11 mostra el contingut en CYP450 per mg de proteïna microsomal, dels lots 008HRSDMC i 029HRSDMC de RLM.

Taula 11 Lot i Contingut de CYP450 en els RLM Obtinguts

Lot	Replicats	Conc proteïna (mg/ml)	Absorció			Contingut en CYP450	
			490 nm	450 nm	(490-450) nm	(nmol/mg)	Mitjana (nmol/mg)
008HRSDMC	1	1	3.8580E-01	4.5364E-01	6.78E-02	0.75	0.7
	2	0.25	9.5723E-03	5.4277E-03	1.50E-02	0.66	
009HRSDMC	<i>n.d.</i>						
010HRSDMC	<i>n.d.</i>						
029HRSDMC	1	1	5.20E-02	1.20E-02	4.00E-02	0.44	0.4
	2	1	4.30E-02	1.00E-02	3.30E-02	0.36	

*n.d.*: No determinat per problemes tècnics.

### 7.1.3 Determinació de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en RLM

A la Taula 12 es mostren els valors d'activitat CYP450 reductasa en lots de RLM que es van utilitzar en el present treball.

Taula 12 Valors de l'Activitat NADPH-CYP450 Reductasa en els Lots de RLM Obtinguts

Lot	Replicat	CYP450 Reductasa (nmol/mg/min)	CYP450 Reductasa Mitjana (nmol/mg/min)
008HRSDMC	1	202.4	226.2
	2	238.1	
	3	238.1	
009HRSDMC	1	238.1	265.9
	2	285.7	
	3	273.8	
010HRSDMC	1	154.8	150.8
	2	154.8	
	3	142.9	
029HRSDMC	1	158.0	171.5
	2	178.1	
	3	178.6	

## 7.2 Cinètiques Enzimàtiques

El lot de microsomes 008HRSDMC es va utilitzar en aquests experiments, excepte en l'estudi de les cinètiques enzimàtiques dels CYP450: CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2, on es va utilitzar el lot 029HRSDMC.

### 7.2.1 *Determinació de la Linealitat en la Producció de Metabòlit CYP-Específic en Funció del Temps i en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal*

Les següents Figures mostren les representacions dels experiments per l'estudi de la linealitat en la producció de metabòlit específic en funció de la concentració de proteïna microsomal (Figura 30) i del temps d'incubació (Figura 31).

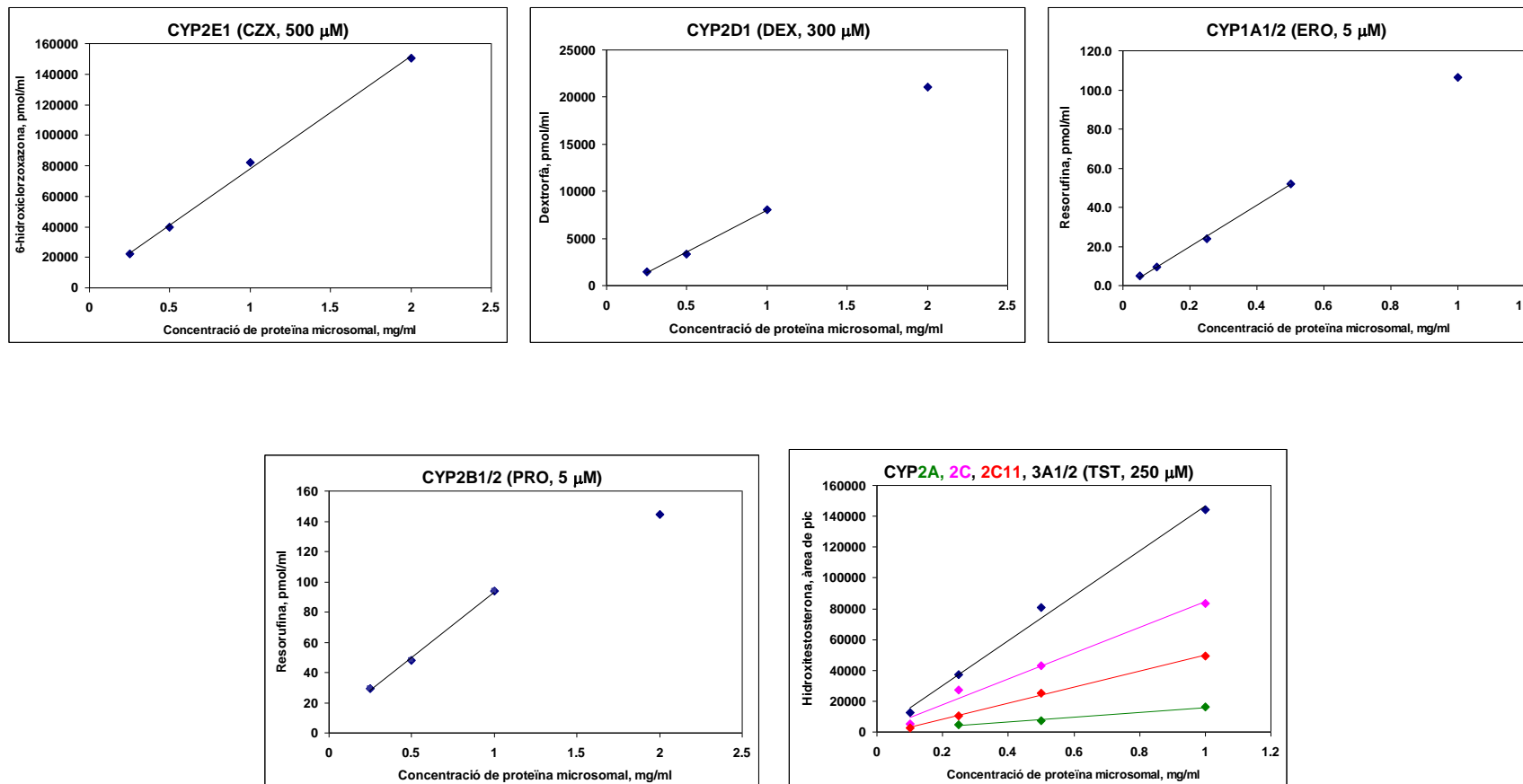
Les representacions de la Figura 30 mostren que la reacció del CYP2E1 és lineal fins que s'incuba a una concentració de proteïna de 2 mg/ml; les reaccions de CYP2D1, CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2 són lineals fins arribar a la concentració de 1 mg/ml; i la reacció específica del CYP1A1/2 és lineal fins la concentració de 0.5 mg/ml.

Les representacions de la Figura 31 mostren que la reacció específica del CYP2E1 és lineal fins als 30 min de temps d'incubació; la reacció del CYP2D1 és lineal fins els 25 min d'incubació; i les reaccions CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2 són lineals fins els 10 min d'incubació.



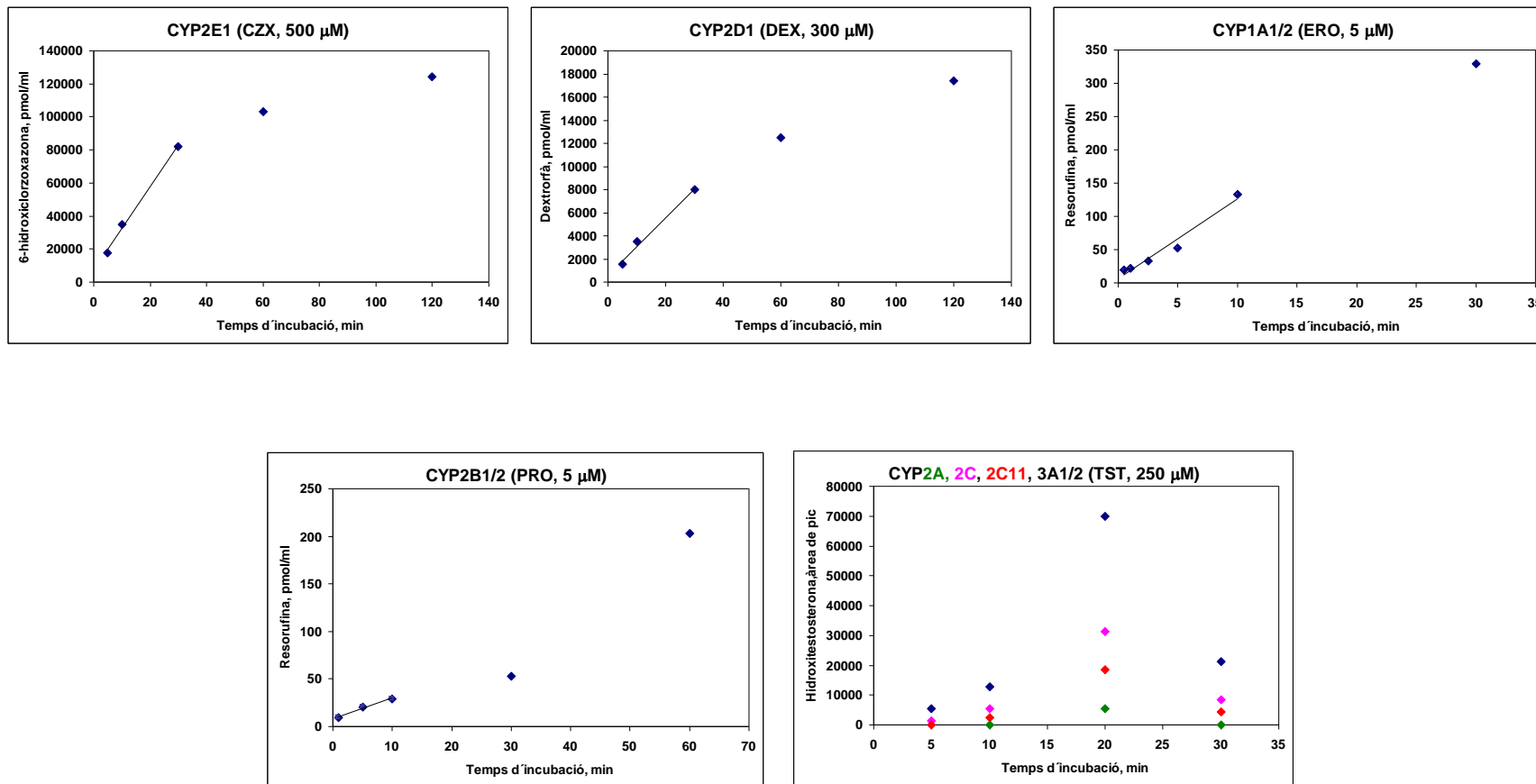
## Resultats

Figura 30 Representacions de la Linealitat en la Producció de Metabòlit Específic en Funció de la Concentració de Proteïna Microsomal per cada CYP450



CZX: cloroxazona, DEX: dextrometorfà, ERO: etoxiresorufina, PRO: pentoxiresorufina, TST: testosterona, Hidroxitesterona: 6- $\beta$ -hidroxitesterona (CYP3A1/2), 16- $\alpha$ -hidroxitesterona (CYP2C), 7- $\alpha$ -hidroxitesterona (CYP2A1/2) o 2- $\alpha$ -hidroxitesterona (CYP2C11).

Figura 31 Representacions de la Linealitat en la Producció de Metabòlit Específic en Funció del Temps d'Incubació per cada CYP450



CZX: cloroxazona, DEX: dextrometorfà, ERO: etoxiresorufina, PRO: pentoxiresorufina, TST: testosterona, Hidroxitetosterona: 6-β-hidroxitetosterona (CYP3A1/2), 16-α-hidroxitetosterona (CYP2C), 7-α-hidroxitetosterona (CYP2A1/2) o 2-α-hidroxitetosterona (CYP2C11).

## Resultats

A partir de la informació obtinguda per observació de les representacions de la Figura 30 i la Figura 31, es van fixar la concentració de proteïna microsomal i el temps d'incubació en cada reacció específica, segons s'indica a la Taula 13.

**Taula 13 Reaccions Específiques de cada CYP450: Temps d'Incubació i Concentració de Proteïna Microsomal**

CYP450	Reacció específica	Temps d'incubació (min)	Concentració de proteïna (mg/ml)
CYP2E1	Cloroxazona-6-hidroxilasa	10	1
CYP2D1	Dextrometorfà-O-demetilasa	20	1
CYP1A1/2	Etoxiresorufin-O-deetilasa	10	0.5
CYP2B1/2	Pentoxiresorufin-O-dealquilasa	10	0.5
CYP2A1/2 CYP2C CYP2C11 CYP3A1/2	Testosterona-7 $\alpha$ -hidroxilasa Testosterona-16 $\alpha$ -hidroxilasa Testosterona-2 $\alpha$ -hidroxilasa Testosterona-6 $\beta$ -hidroxilasa	10	0.5

### 7.2.2 Determinació dels Paràmetres Cinètic-Enzimàtics $K_m$ i $V_{max}$

A la Taula 14 i a la Taula 15 es mostren els valors dels paràmetres cinètics ( $K_m$  i  $V_{max}$ ), el coeficient de variació (%) de l'estimació dels paràmetres, la desviació estàndard, i els criteris estadístics d'AIC i SBC. Tot això, per cada reacció específica i cada model cinètic (M-M i Hill).

Taula 14 Paràmetres Cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$ . Models de Michaelis-Menten i de Hill. CYP2E1, CYP2D1, CYP1A1/2 i CYP2B1/2

Ajustat equació Michaelis-Menten

CYP450	CYP2E1 <sup>(M-M)</sup>					CYP2D1 <sup>(M-M)</sup>					CYP1A1/2					CYP2B1/2 <sup>(M-M)</sup>				
	Clorzoxazona-6-hidroxilasa					Dextrometorfà-O-demetilasa					Etoxirosorufina-O-dealquilasa					Pentoxirosorufina-O-dealquilasa				
	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC
$V_{max}$	<b>5006.7</b>	86.1	1.7	297.5	299.8	<b>433.1</b>	7.2	1.7	72.5	72.9	<b>132.9</b>	3.9	2.9	127.7	129.5	<b>13.7</b>	0.6	4.4	30.6	31.5
$K_m$	<b>223.2</b>	11.7	5.3			<b>6.6</b>	0.8	12.2			<b>0.6</b>	0.1	11.6			<b>3.3</b>	0.6	17.0		

Ajustat equació de Hill (Sigmoidal)

CYP450	CYP2E1					CYP2D1					CYP1A1/2 <sup>(H)</sup>					CYP2B1/2				
	Clorzoxazona-6-hidroxilasa					Dextrometorfà-O-demetilasa					Etoxirosorufina-O-dealquilasa					Pentoxirosorufina-O-dealquilasa				
	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC
$V_{max}$	<b>4885.9</b>	187.3	3.8	299.0	302.5	<b>437.9</b>	11.4	2.6	73.8	74.4	<b>161.4</b>	19.9	12.3	123.0	125.7	<b>13.4</b>	1.0	7.8	32.4	33.9
$K_m$	<b>210.3</b>	20.7	9.8			<b>6.6</b>	0.9	14.1			<b>1.0</b>	0.5	45.1			<b>3.2</b>	0.6	19.8		
$\gamma$	<b>1.0</b>	0.1	5.7			<b>0.9</b>	0.2	18.6			<b>0.6</b>	0.1	19.3			<b>1.1</b>	0.3	26.3		

 $V_{max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min) $K_m$ : constant de Michaelis-Menten ( $\mu M$ ) $\gamma$ : factor de sigmoidicitat

SD: desviació estàndar

CV(%): coeficient de variació (%)

AIC: criteri estadístic d'Akaike

SBC: criteri estadístic de Schwartz

(M-M): els valors d'AIC i SBC indiquen que el model de M-M ajusta millor a les dades

(H): els valors d'AIC i SBC indiquen que el model de Hill ajusta millor a les dades

CYP1A1/2: els valors de CV% dels paràmetres estimats són inferiors quan el model de M-M s'ajusta a les dades

## Resultats

Taula 15 Paràmetres Cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$ . Models de Michaelis-Menten i de Hill. CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2

Ajustat equació Michaelis-Menten

CYP450	CYP2A1/2 <sup>(M-M)</sup>					CYP2C					CYP2C11					CYP3A1/2				
	Testosterona-7- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-16- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-2- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-6- $\beta$ -hidroxilasa				
	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC
$V_{max}$	<b>191.7</b>	6.3	3.3	152.6	154.4	<b>1176.6</b>	80.1	6.8	223.1	224.9	<b>686.9</b>	33.1	4.8	196.4	198.2	<b>2278.0</b>	75.6	3.3	230.1	231.9
$K_m$	<b>10.9</b>	1.9	17.8			<b>60.7</b>	12.9	21.2			<b>44.6</b>	7.3	16.4			<b>34.0</b>	4.2	12.2		

Ajustat equació de Hill (Sigmoidal)

CYP450	CYP2A1/2					CYP2C <sup>(H)</sup>					CYP2C11 <sup>(H)</sup>					CYP3A1/2 <sup>(H)</sup>				
	Testosterona-7- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-16- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-2- $\alpha$ -hidroxilasa					Testosterona-6- $\beta$ -hidroxilasa				
	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC	valor	SD	CV%	AIC	SBC
$V_{max}$	<b>196.1</b>	13.3	6.8	154.4	157.0	<b>1007.6</b>	48.1	4.8	213.5	216.0	<b>635.3</b>	35.2	5.5	194.8	197.0	<b>2167.1</b>	94.1	4.3	229.6	232.0
$K_m$	<b>10.9</b>	2.3	20.7			<b>44.7</b>	4.8	10.7			<b>38.3</b>	5.3	13.9			<b>30.9</b>	3.6	11.6		
$\gamma$	<b>0.9</b>	0.3	29.2			<b>1.7</b>	0.3	16.1			<b>1.3</b>	0.2	16.0			<b>1.2</b>	0.2	13.0		

$V_{max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min)

$K_m$ : constant de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )

$\gamma$ : factor de sigmoidicitat

SD: desviació estàndar

CV(%): coeficient de variació (%)

AIC: criteri estadístic d'Akaike

SBC: criteri estadístic de Schwartz

(M-M): els valors d'AIC i SBC indiquen que el model de M-M ajusta millor a les dades

(H): els valors d'AIC i SBC indiquen que el model de Hill ajusta millor a les dades

CYP3A1/2: el valor d'AIC és menor en l'ajustat de Hill, el valor de SBC és menor en l'ajustat de M-M

Segons la informació obtinguda de les taules, els models seleccionats que es van seleccionar van ser el de M-M per ajustar les activitats dels CYP450 2E1, 2D1, 2B1/2 i 2A1/2, i el model de Hill per ajustar les activitats dels CYP450 1A1/2, 2C, 2C11 i CYP3A1/2.

Amb aquesta referència es va establir que les equacions d'inhibició que s'ajustarien en l'estudi s'inhibició *in vitro* serien les deduïdes l'equació de M-M per totes les isoformes CYP450, i a més a més, les equacions deduïdes de l'equació de Hill per les isoformes: CYP1A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2.

### **7.3 Estudi *In vitro* d'Inhibició de les CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1/2, 2C, 2C11, 2D1, 2E1 i 3A1/2 per la KTA, la XYL, el KT, la BN i el FEN**

Les següents Taules mostren els valors d'activitat enzimàtica adquirits en els experiments d'inhibició, que es descriuen a la secció 5.5. Els valors s'obtenen de forma individual dels cinc fàrmacs (KT, KTA, XYL, BN i FEN), per les vuit isoformes CYP450 (CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1 i CYP3A1/2).

## Resultats

Taula 16 Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA

Concentració Ketoprofè $\mu\text{M}$	Concentració cloroxazona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6-hidroxicloroxazona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	50	617.4	592.9	1436.1	882.1	479.9	54.4
	250	2002.8	1932.1	<i>m.p.</i>	1967.4	-	-
	500	2684.4	2960.2	2629.7	2758.1	177.2	6.4
	1000	3427.7	3451.7	3371.9	3417.1	41.0	1.2
25	100	1438.9	1282.5	1425.8	1382.4	86.7	6.3
	250	1961.2	2078.1	1933.5	1990.9	76.8	3.9
	500	2215.1	2864.7	2674.8	2584.9	334.0	12.9
	1000	3882.4	3383.0	3528.3	3597.9	256.9	7.1
50	100	935.9	980.8	981.6	966.1	26.2	2.7
	250	2062.0	2001.5	1966.8	2010.1	48.2	2.4
	500	2778.0	2586.2	2680.5	2681.6	95.9	3.6
	1000	3621.7	3473.3	3557.8	3550.9	74.4	2.1
1250	100	1261.0	1129.6	1125.9	1172.1	77.0	6.6
	250	1810.7	1914.6	1930.5	1885.2	65.1	3.5
	500	2612.7	2492.9	2817.1	2640.9	163.9	6.2
	1000	3489.6	3498.0	3502.0	3496.5	6.3	0.2
5000	100	1179.8	1178.9	984.2	1114.3	112.7	10.1
	250	1940.6	1806.1	1822.1	1856.3	73.5	4.0
	500	2904.5	2448.9	2234.6	2529.4	342.1	13.5
	1000	3292.5	3277.3	3149.4	3239.7	78.6	2.4

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi  
 -: no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina $\mu\text{M}$	Concentració cloroxazona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6-hidroxicloroxazona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	50	137.2	140.9	132.3	136.8	4.3	3.1
	250	813.8	814.9	777.5	802.1	21.3	2.7
	500	1159.2	1202.4	1229.9	1197.2	35.6	3.0
	1000	1721.5	1511.8	1581.3	1604.9	106.8	6.7
5	100	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	-	-
	250	770.5	759.3	764.5	764.8	5.6	0.7
	500	1207.3	1194.5	1266.1	1222.6	38.2	3.1
	1000	2513.1	1775.0	1913.4	2067.2	392.4	19.0
25	100	269.7	268.0	273.8	270.5	3.0	1.1
	250	667.1	717.0	717.1	700.4	28.9	4.1
	500	982.4	978.6	1109.0	1023.3	74.2	7.3
	1000	1658.4	1767.0	1811.7	1745.7	78.9	4.5
75	100	264.1	265.6	261.2	263.6	2.3	0.9
	250	643.7	665.0	597.6	635.4	34.5	5.4
	500	1169.0	1133.1	1174.5	1158.9	22.5	1.9
	1000	1635.3	1637.0	1724.8	1665.7	51.2	3.1
375	100	244.6	250.9	275.0	256.8	16.0	6.2
	250	580.5	575.0	588.6	581.3	6.8	1.2
	500	1139.4	1188.5	1104.5	1144.1	42.2	3.7
	1000	1681.1	1639.3	1684.4	1668.3	25.1	1.5

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi  
 -: no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 17 Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració clorzoxazona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6-hidroxiclorzoxazona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	50	361.6	359.7	354.5	358.6	3.7	1.0
	250	1162.8	1135.5	1135.3	1144.5	15.8	1.4
	500	1418.6	1432.0	1329.3	1393.3	55.8	4.0
	1000	1826.6	1735.9	1678.1	1746.9	74.8	4.3
0.02	100	615.2	620.2	614.4	616.6	3.2	0.5
	250	1083.1	1444.3	1297.3	1274.9	181.6	14.2
	500	1656.6	1383.0	1318.6	1452.7	179.5	12.4
	1000	1303.5	1553.4	1493.9	1450.3	130.5	9.0
0.1	100	681.4	619.6	542.6	614.5	69.5	11.3
	250	1181.2	1271.8	1201.6	1218.2	47.5	3.9
	500	1285.3	1259.7	1171.7	1238.9	59.6	4.8
	1000	1274.1	2138.0	1324.5	1578.9	484.9	30.7
0.5	100	661.6	646.6	653.0	653.7	7.5	1.1
	250	1222.2	1214.8	1148.4	1195.1	40.7	3.4
	500	1514.8	1494.5	1423.0	1477.4	48.2	3.3
	1000	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	1754.3	1754.3	-	-
2.5	100	674.1	693.5	643.1	670.2	25.4	3.8
	250	1138.4	1217.6	1179.1	1178.4	39.6	3.4
	500	1671.4	1667.5	1644.3	1661.1	14.7	0.9
	1000	1838.7	2048.7	1953.5	1947.0	105.2	5.4

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració clorzoxazona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6-hidroxiclorzoxazona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	50	559.0	547.4	586.0	564.1	19.8	3.5
	250	1487.3	1575.6	1469.1	1510.7	57.0	3.8
	500	2510.0	2370.4	2486.4	2455.6	74.7	3.0
	1000	2944.6	3035.9	3027.5	3002.7	50.5	1.7
0.1	100	917.5	975.9	895.0	929.5	41.8	4.5
	250	1457.5	1665.4	1756.0	1626.3	153.1	9.4
	500	2471.0	2426.5	2190.5	2362.7	150.7	6.4
	1000	3001.8	2936.0	2693.0	2876.9	162.7	5.7
0.5	100	976.9	889.0	907.6	924.5	46.4	5.0
	250	1743.7	1747.3	1659.1	1716.7	49.9	2.9
	500	2430.0	2377.1	2301.9	2369.6	64.4	2.7
	1000	2962.1	2995.7	2956.8	2971.6	21.1	0.7
5	100	891.5	977.5	952.2	940.4	44.2	4.7
	250	1708.8	1797.2	1762.4	1756.1	44.5	2.5
	500	2224.5	2198.4	2163.7	2195.5	30.5	1.4
	1000	2883.7	2495.4	2827.7	2735.6	209.9	7.7
20	100	978.4	778.6	874.2	877.1	99.9	11.4
	250	1832.4	1848.8	1749.1	1810.1	53.5	3.0
	500	2447.1	2320.8	2509.1	2425.7	95.9	4.0
	1000	2605.6	2933.5	2913.4	2817.5	183.8	6.5



## Resultats

Taula 18 Estudi d'Inhibició del CYP2E1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració clorzoxazona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6-hidroxiclorzoxazona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	50	732.9	705.2	663.3	700.5	35.0	5.0
	250	2164.0	2119.9	2106.3	2130.1	30.2	1.4
	500	2816.3	3001.3	3008.1	2941.9	108.9	3.7
	1000	3693.3	3550.9	3526.5	3590.2	90.1	2.5
2.5	100	1283.8	1282.3	1215.3	1260.5	39.1	3.1
	250	2035.0	2038.4	2071.3	2048.2	20.1	1.0
	500	2942.7	2926.2	2922.9	2930.6	10.6	0.4
	1000	3489.1	3497.9	3366.3	3451.1	73.6	2.1
10	100	1084.3	1072.7	1199.4	1118.8	70.1	6.3
	250	2232.9	2234.2	2100.0	2189.0	77.1	3.5
	500	2989.0	2951.1	3018.8	2986.3	33.9	1.1
	1000	3380.1	3396.5	3580.2	3452.2	111.1	3.2
50	100	1108.5	1214.8	1103.2	1142.2	63.0	5.5
	250	2134.2	2011.0	2191.7	2112.3	92.3	4.4
	500	3042.4	2956.6	2877.5	2958.8	82.5	2.8
	1000	3468.0	3502.7	3326.4	3432.4	93.4	2.7
250	100	948.5	988.6	948.7	961.9	23.1	2.4
	250	1916.0	2125.9	1879.4	1973.8	133.0	6.7
	500	2797.2	2686.9	2693.5	2725.9	61.8	2.3
	1000	3352.9	3004.4	3291.1	3216.1	185.9	5.8

Taula 19 Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat).Incubacions amb KT i amb KTA

Concentració Ketoprofè µM	Concentració dextrometorfà µM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) dextroorfà					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	5	121.9	123.7	130.4	125.3	4.5	3.6
	25	315.1	225.3	201.9	247.4	59.8	24.2
	250	351.5	374.0	335.6	353.7	19.3	5.4
	1500	363.0	347.5	363.1	357.8	9.0	2.5
25	25	201.9	192.9	200.6	198.5	4.8	2.4
	250	<i>m.p.</i>	359.2	330.7	345.0	-	-
	500	314.7	352.6	340.9	336.1	19.4	5.8
	1500	346.1	313.8	334.4	331.4	16.4	4.9
50	25	192.6	183.5	181.7	185.9	5.8	3.1
	250	340.2	368.8	365.0	358.0	15.5	4.3
	500	371.9	361.0	361.8	364.9	6.1	1.7
	1500	351.4	321.8	315.9	329.7	19.0	5.8
1250	25	166.9	436.4	240.9	281.4	139.2	49.5
	250	309.4	333.6	327.6	323.6	12.6	3.9
	500	349.2	341.6	351.9	347.6	5.3	1.5
	1500	298.0	281.7	277.0	285.6	11.0	3.9
5000	25	177.9	183.7	91.7	151.1	51.5	34.1
	250	307.8	281.3	303.8	297.6	14.3	4.8
	500	256.7	261.5	250.8	256.4	5.4	2.1
	1500	194.3	188.5	198.4	193.7	4.9	2.5

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina µM	Concentració dextrometorfà µM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) dextroorfà					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	5	70.0	68.9	67.6	68.9	1.2	1.7
	25	143.2	138.3	140.2	140.6	2.5	1.8
	250	198.4	199.4	195.8	197.9	1.9	0.9
	1500	184.1	174.4	175.9	178.1	5.2	2.9
5	25	142.5	139.5	136.0	139.3	3.2	2.3
	250	188.4	185.6	189.3	187.8	1.9	1.0
	500	196.0	191.1	184.6	190.6	5.7	3.0
	1500	167.2	160.8	169.8	165.9	4.6	2.8
25	25	133.9	136.1	132.2	134.0	1.9	1.5
	250	176.5	188.2	193.2	186.0	8.6	4.6
	500	177.1	183.7	174.1	178.3	4.9	2.8
	1500	172.9	174.4	172.7	173.3	0.9	0.5
75	25	135.0	126.1	126.9	129.3	4.9	3.8
	250	179.7	173.7	171.5	175.0	4.3	2.4
	500	181.2	176.5	168.2	175.3	6.5	3.7
	1500	155.8	165.0	167.7	162.8	6.3	3.8
375	25	91.6	91.0	88.8	90.5	1.5	1.6
	250	158.0	168.6	163.3	163.3	5.3	3.3
	500	167.9	147.8	157.8	157.8	10.1	6.4
	1500	168.1	144.9	156.6	156.5	11.6	7.4

## Resultats

Taula 20 Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració dextrometorfà $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) dextroorfà					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	5	173.0	164.2	172.7	169.9	5.0	3.0
	25	417.9	418.6	424.5	420.3	3.7	0.9
	250	370.7	371.4	374.4	372.2	2.0	0.5
	1500	336.6	344.4	343.7	341.5	4.3	1.3
0.02	25	337.6	308.8	311.2	319.2	16.0	5.0
	250	418.3	409.9	410.3	412.8	4.8	1.2
	500	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	-	-
0.1	1500	338.9	312.8	334.5	328.8	14.0	4.3
	25	309.7	325.6	308.0	314.4	9.7	3.1
	250	411.1	413.7	407.1	410.6	3.3	0.8
	500	380.3	385.9	363.8	376.7	11.5	3.0
0.5	1500	289.6	324.4	295.8	303.3	18.6	6.1
	25	323.0	330.3	331.4	328.2	4.6	1.4
	250	420.4	409.2	417.3	415.7	5.8	1.4
	500	378.1	379.5	387.6	381.7	5.1	1.3
2.5	1500	332.1	286.1	298.8	305.7	23.8	7.8
	25	320.6	320.8	324.2	321.9	2.0	0.6
	250	421.0	423.8	427.5	424.1	3.3	0.8
	500	433.8	423.4	418.5	425.2	7.8	1.8
	1500	329.8	315.8	296.5	314.1	16.7	5.3

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi  
 '-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració dextrometorfà $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) dextroorfà					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	5	157.9	150.4	152.9	153.7	3.8	2.5
	25	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	-	-
	250	324.5	318.7	318.8	320.7	3.3	1.0
	500	269.6	268.4	264.9	267.6	2.4	0.9
0.1	5	276.6	271.0	262.1	269.9	7.3	2.7
	25	305.4	281.5	302.5	296.5	13.1	4.4
	250	282.9	278.5	271.6	277.7	5.7	2.1
	500	263.5	267.9	257.9	263.1	5.0	1.9
0.5	5	277.2	272.0	273.9	274.3	2.6	1.0
	25	324.7	322.6	326.8	324.7	2.1	0.6
	250	264.7	273.2	281.7	273.2	8.5	3.1
	500	237.4	256.4	247.9	247.2	9.5	3.9
5	5	255.3	246.6	247.8	249.9	4.7	1.9
	25	317.8	262.0	302.4	294.1	28.8	9.8
	250	283.9	360.0	315.6	319.8	38.2	11.9
	500	242.1	227.3	235.0	234.8	7.4	3.1
20	5	231.5	239.7	241.3	237.5	5.2	2.2
	25	297.1	298.0	294.3	296.5	2.0	0.7
	250	334.4	335.9	325.5	331.9	5.6	1.7
	500	231.8	242.9	245.9	240.2	7.4	3.1

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi  
 '-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 21 Estudi d'Inhibició del CYP2D1. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració dextrometorfà $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) dextrorfà					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	5	9.4	9.3	9.1	9.3	0.2	2.1
	25	207.1	200.9	196.8	201.6	5.2	2.6
	250	138.7	131.5	135.6	135.3	3.6	2.7
	500	129.8	129.5	139.2	132.8	5.5	4.1
2.5	5	7.8	7.8	7.8	7.8	0.0	0.2
	25	188.3	184.0	177.5	183.3	5.4	3.0
	250	129.9	129.0	134.4	131.1	2.9	2.2
	500	141.9	137.3	137.4	138.9	2.7	1.9
10	5	5.1	5.4	5.3	5.3	0.2	3.1
	25	171.2	172.4	166.9	170.2	2.9	1.7
	250	130.3	130.8	135.1	132.1	2.7	2.0
	500	133.8	145.3	148.1	142.4	7.6	5.3
50	5	3.4	3.3	3.4	3.4	0.1	2.2
	25	111.2	115.5	117.4	114.7	3.2	2.8
	250	122.7	122.5	124.4	123.2	1.0	0.8
	500	129.0	132.1	137.7	132.9	4.4	3.3
250	5	2.5	2.5	2.6	2.6	0.1	2.2
	25	61.8	54.1	52.9	56.3	4.8	8.6
	250	92.3	95.6	93.9	93.9	1.6	1.7
	500	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	-	-

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

## Resultats

**Taula 22 Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA**

Concentració Ketoprofè $\mu\text{M}$	Concentració etoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	0.25	7.6	8.0	8.1	7.9	0.3	3.4
	5	17.4	18.6	19.3	18.4	1.0	5.2
	10	35.1	35.6	28.8	33.2	3.8	11.4
	50	23.1	21.0	21.9	22.0	1.1	4.9
50	1	12.4	12.3	12.0	12.2	0.2	1.7
	5	17.7	17.2	18.6	17.9	0.7	4.0
	10	23.2	37.6	31.5	30.8	7.2	23.5
	50	21.0	22.3	21.2	21.5	0.7	3.2
200	1	11.4	11.9	12.2	11.8	0.4	3.8
	5	15.7	15.5	16.0	15.7	0.3	1.8
	10	21.4	31.9	m.p.	26.7	-	-
	50	21.4	20.8	21.2	21.1	0.3	1.5
1250	1	8.4	9.0	8.7	8.7	0.3	3.8
	5	11.7	11.2	11.8	11.6	0.3	2.9
	10	m.p.	m.p.	m.p.	-	-	-
	50	14.6	13.8	14.2	14.2	0.4	2.9
5000	1	6.8	6.4	5.6	6.3	0.6	9.8
	5	7.2	7.5	7.7	7.5	0.3	3.8
	10	7.4	9.6	6.6	7.9	1.6	19.7
	50	8.3	8.1	9.1	8.5	0.5	5.9

m.p.: mostra perduda durant l'anàlisi

-' : no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina $\mu\text{M}$	Concentració etoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	0.25	7.0	6.7	7.9	7.2	0.6	8.5
	5	9.4	9.1	8.8	9.1	0.3	3.4
	10	6.8	6.2	6.3	6.5	0.3	5.1
	50	6.4	6.2	6.3	6.3	0.1	1.9
5	1	6.2	6.4	m.p.	6.3	-	-
	5	8.1	9.1	8.4	8.5	0.5	5.8
	10	5.6	m.p.	5.9	5.7	-	-
	50	6.2	6.7	6.5	6.5	0.3	4.3
25	1	5.5	6.7	6.9	6.3	0.7	11.7
	5	7.3	7.6	7.8	7.6	0.2	3.1
	10	5.0	5.2	5.2	5.1	0.2	3.0
	50	6.1	5.9	5.6	5.9	0.3	4.4
75	1	5.8	6.4	6.7	6.3	0.5	7.6
	5	7.0	7.8	7.1	7.3	0.4	6.0
	10	5.1	4.6	5.0	4.9	0.3	5.1
	50	5.3	5.3	5.5	5.4	0.1	1.6
375	1	5.5	5.2	5.7	5.5	0.2	4.2
	5	5.8	5.9	6.1	5.9	0.1	2.3
	10	4.2	4.1	4.1	4.1	0.0	1.0
	50	4.5	4.7	4.6	4.6	0.1	2.5

m.p.: mostra perduda durant l'anàlisi

-' : no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 23 Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració etoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	0.25	6.3	6.6	6.7	6.5	0.2	3.3
	5	8.4	9.0	7.4	8.3	0.8	9.7
	10	8.2	7.6	7.6	7.8	0.4	4.8
	50	6.9	7.3	6.7	7.0	0.3	3.8
0.02	1	8.9	9.1	8.4	8.8	0.4	4.2
	5	7.3	8.0	10.0	8.4	1.4	16.8
	10	7.5	7.5	7.0	7.3	0.3	3.6
	50	7.2	7.2	6.1	6.8	0.6	9.3
0.1	1	8.2	8.1	8.7	8.3	0.3	3.9
	5	10.5	<i>m.p.</i>	9.7	10.1	-	-
	10	7.6	6.8	6.7	7.1	0.5	7.0
	50	6.5	6.7	6.5	6.6	0.1	1.8
0.5	1	8.9	7.9	7.6	8.1	0.7	8.4
	5	9.3	9.6	9.1	9.3	0.2	2.6
	10	6.7	9.5	9.8	8.7	1.7	20.0
	50	6.7	7.0	6.3	6.7	0.3	5.2
2.5	1	8.5	8.2	8.4	8.4	0.1	1.8
	5	9.0	8.9	8.5	8.8	0.3	3.0
	10	8.2	8.1	7.3	7.9	0.5	6.6
	50	6.7	6.5	6.5	6.6	0.1	1.7

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració etoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	0.25	12.5	12.9	12.8	12.7	0.2	1.7
	5	24.4	23.4	23.8	23.9	0.5	2.1
	10	22.3	21.2	21.2	21.6	0.7	3.0
	50	19.8	19.0	17.4	18.7	1.2	6.4
0.1	1	18.1	18.1	17.4	17.8	0.4	2.3
	5	23.3	24.4	23.9	23.9	0.5	2.2
	10	21.0	25.8	22.4	23.0	2.5	10.7
	50	17.6	19.7	16.2	17.8	1.8	9.9
0.5	1	18.0	18.3	16.8	17.7	0.8	4.5
	5	24.0	23.7	24.0	23.9	0.2	0.7
	10	25.7	24.8	22.3	24.3	1.8	7.4
	50	17.0	18.7	18.1	17.9	0.9	4.8
5	1	17.4	17.9	15.6	17.0	1.2	7.1
	5	20.8	20.5	20.4	20.6	0.2	1.1
	10	20.7	21.8	20.8	21.1	0.6	2.7
	50	16.6	16.5	17.5	16.9	0.6	3.3
20	1	15.5	16.0	16.0	15.8	0.3	1.9
	5	16.7	17.8	17.6	17.3	0.6	3.4
	10	19.1	18.9	17.7	18.6	0.7	4.0
	50	14.2	13.7	15.1	14.4	0.7	5.1

## Resultats

Taula 24 Estudi d'Inhibició del CYP1A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració etoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	0.25	9.6	9.1	11.0	9.9	1.0	10.0
	5	11.0	20.6	19.8	17.2	5.3	31.0
	10	<i>m.p.</i>	15.3	17.9	16.6	-	-
	50	16.3	<i>m.p.</i>	14.6	15.5	-	-
2.5	1	12.8	13.9	15.0	13.9	1.1	8.2
	5	19.9	<i>m.p.</i>	18.4	19.2	-	-
	10	18.5	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	18.5	-	-
	50	12.8	<i>m.p.</i>	12.5	12.7	-	-
10	1	13.0	13.3	13.9	13.4	0.5	3.7
	5	17.6	17.8	<i>m.p.</i>	17.7	-	-
	10	16.8	16.9	17.2	17.0	0.2	1.4
	50	12.8	12.3	<i>m.p.</i>	12.6	-	-
50	1	12.7	12.5	13.8	13.0	0.7	5.6
	5	17.9	<i>m.p.</i>	16.5	17.2	-	-
	10	17.5	15.6	14.6	15.9	1.5	9.2
	50	13.5	12.0	<i>m.p.</i>	12.8	-	-
250	1	16.1	14.8	15.7	15.5	0.7	4.4
	5	<i>m.p.</i>	17.5	17.7	17.6	-	-
	10	17.2	16.6	<i>m.p.</i>	16.9	-	-
	50	14.3	13.5	13.6	13.8	0.4	3.0

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 25 Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA

Concentració Ketoprofè $\mu\text{M}$	Concentració pentoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2	4.6	4.3	4.3	4.4	0.2	4.0
	5	5.6	5.8	5.8	5.7	0.1	2.5
	10	7.6	8.3	7.5	7.8	0.4	5.5
	50	9.4	10.8	9.6	9.9	0.7	7.6
50	5	5.5	5.6	5.8	5.6	0.2	3.2
	10	7.2	8.0	8.3	7.8	0.5	6.8
	25	12.9	12.3	11.6	12.3	0.6	5.1
	50	8.7	8.9	9.2	8.9	0.3	2.8
200	5	5.5	5.5	5.6	5.5	0.1	1.1
	10	7.0	8.3	7.5	7.6	0.6	8.4
	25	7.6	7.8	7.7	7.7	0.1	1.6
	50	9.1	8.5	8.6	8.8	0.3	3.8
1250	5	4.2	4.0	4.1	4.1	0.1	2.2
	10	4.8	5.8	5.9	5.5	0.6	10.9
	25	6.4	6.1	6.3	6.3	0.1	2.1
	50	7.5	7.2	7.8	7.5	0.3	3.8
5000	5	2.2	1.9	2.5	2.2	0.3	13.0
	10	3.1	2.6	3.0	2.9	0.3	9.1
	25	3.8	3.4	m.p.	3.6	-	-
	50	4.5	4.5	4.2	4.4	0.2	4.2

m.p.: mostra perduda durant l'anàlisi

-' : no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina $\mu\text{M}$	Concentració pentoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2	1.6	1.6	1.5	1.6	0.1	4.8
	5	2.7	2.9	2.8	2.8	0.1	3.2
	10	3.9	3.8	3.7	3.8	0.1	2.4
	50	5.5	5.4	5.5	5.5	0.0	0.8
5	5	2.4	2.4	2.1	2.3	0.1	6.0
	10	3.3	3.1	3.4	3.3	0.2	4.9
	25	m.p.	4.0	4.2	4.1	-	-
	50	4.8	4.7	4.8	4.7	0.1	1.2
25	5	1.8	1.9	2.0	1.9	0.1	6.4
	10	2.5	2.5	2.2	2.4	0.1	5.6
	25	3.3	3.3	3.3	3.3	0.0	1.0
	50	4.1	4.6	4.0	4.3	0.3	7.4
75	5	1.4	1.3	1.3	1.3	0.0	3.0
	10	1.9	1.9	1.8	1.9	0.0	1.6
	25	2.9	2.7	2.6	2.7	0.1	4.6
	50	3.5	3.7	3.7	3.6	0.1	3.7
375	5	0.9	0.6	0.7	0.7	0.1	19.7
	10	1.3	1.2	1.3	1.3	0.0	2.4
	25	2.3	2.4	2.4	2.4	0.1	3.0
	50	2.7	2.9	2.8	2.8	0.1	3.4

m.p.: mostra perduda durant l'anàlisi

-' : no es pot calcular perquè  $n < 2$



## Resultats

**Taula 26 Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN**

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració pentoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2	1.2	1.3	0.9	1.1	0.2	17.2
	5	2.3	2.1	2.0	2.1	0.2	7.5
	10	4.6	3.7	3.6	4.0	0.5	13.3
	50	8.4	6.9	7.0	7.5	0.8	11.1
0.02	5	1.9	1.9	1.7	1.8	0.1	5.1
	10	3.8	3.3	3.6	3.6	0.3	7.6
	25	5.8	5.4	6.1	5.8	0.4	6.6
	50	7.1	7.2	6.8	7.0	0.2	3.0
0.1	5	1.7	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	1.7	-	-
	10	3.7	3.3	3.7	3.6	0.2	6.0
	25	5.7	6.0	5.5	5.7	0.2	4.1
	50	6.6	6.4	6.4	6.5	0.1	1.8
0.5	5	1.9	1.9	<i>m.p.</i>	1.9	-	-
	10	3.6	3.8	3.5	3.7	0.2	4.2
	25	4.4	5.1	4.8	4.8	0.3	6.9
	50	5.7	6.3	6.4	6.1	0.4	6.7
2.5	5	1.9	1.7	2.2	1.9	0.2	11.8
	10	3.5	3.3	3.7	3.5	0.2	4.6
	25	4.6	4.9	4.9	4.8	0.2	3.3
	50	6.5	7.0	6.5	6.7	0.3	4.3

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració pentoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2	3.3	2.6	2.9	2.9	0.4	12.2
	5	3.9	3.6	3.9	3.8	0.2	5.0
	10	5.2	4.6	5.4	5.1	0.5	8.9
	50	9.3	8.3	9.5	9.0	0.6	6.7
0.1	5	3.8	3.8	<i>m.p.</i>	3.8	-	-
	10	4.0	3.7	4.6	4.1	0.4	10.7
	25	8.1	8.2	7.3	7.9	0.5	6.8
	50	8.0	7.3	8.0	7.8	0.4	5.0
0.5	5	<i>m.p.</i>	3.5	3.2	3.3	-	-
	10	4.5	3.8	4.1	4.1	0.3	7.9
	25	8.3	7.4	6.4	7.4	0.9	12.9
	50	8.9	7.6	8.1	8.2	0.7	8.1
5	5	3.9	3.8	3.5	3.7	0.2	6.1
	10	5.1	5.5	5.8	5.5	0.4	6.8
	25	6.4	7.3	7.3	7.0	0.5	7.2
	50	7.8	7.2	8.2	7.7	0.5	6.8
20	5	3.2	3.3	3.2	3.2	0.1	1.9
	10	3.8	4.6	5.5	4.6	0.8	17.6
	25	6.2	6.2	7.0	6.5	0.4	6.9
	50	6.4	7.4	7.6	7.1	0.6	8.4

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 27 Estudi d'Inhibició del CYP2B1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració pentoxiresorufina $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) resorufina					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2	2.3	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	2.3	-	-
	5	3.5	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.5	-	-
	10	4.6	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	4.6	-	-
	50	5.3	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.3	-	-
2.5	5	3.3	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.3	-	-
	10	3.9	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.9	-	-
	25	5.1	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.1	-	-
	50	5.2	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.2	-	-
10	5	3.0	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.0	-	-
	10	3.6	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.6	-	-
	25	4.6	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	4.6	-	-
	50	5.0	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.0	-	-
50	5	3.2	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.2	-	-
	10	3.8	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	3.8	-	-
	25	4.3	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	4.3	-	-
	50	4.6	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	4.6	-	-
250	5	4.5	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	4.5	-	-
	10	5.0	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.0	-	-
	25	5.4	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.4	-	-
	50	5.4	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.4	-	-

*m.p.*: mostra perduda durant l'anàlisi

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

## Resultats

**Taula 28 Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA**

Concentració Ketoprofè μM	Concentració testosterona μM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 7-α-hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	10.4	10.2	10.2	10.3	0.1	1.1
	10	44.7	46.9	46.7	46.1	1.2	2.6
	50	64.7	65.6	65.8	65.4	0.6	0.9
	350	72.7	73.3	74.9	73.6	1.1	1.5
50	2.5	8.6	9.7	9.9	9.4	0.7	7.4
	10	45.2	43.8	43.4	44.1	1.0	2.2
	50	56.9	61.9	63.3	60.7	3.3	5.5
	350	69.5	71.1	70.0	70.2	0.8	1.1
200	2.5	12.3	13.9	13.7	13.3	0.9	6.6
	10	46.1	48.1	49.9	48.0	1.9	4.0
	50	61.4	61.3	58.0	60.2	1.9	3.2
	350	67.6	70.0	71.1	69.6	1.8	2.6
1250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	13.0	13.0	-	-
	10	46.8	53.3	46.0	48.7	4.0	8.3
	50	58.3	57.3	58.8	58.1	0.8	1.3
	350	67.4	68.2	74.1	69.9	3.6	5.2
5000	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	11.6	11.6	-	-
	10	36.4	36.4	39.6	37.5	1.8	4.9
	50	44.2	42.9	41.2	42.8	1.5	3.6
	350	56.2	62.7	58.4	59.1	3.4	5.7

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè n<2

Concentració Ketamina μM	Concentració testosterona μM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 7-α-hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	32.2	33.7	25.6	30.5	4.3	14.2
	10	84.7	95.4	93.0	91.1	5.6	6.2
	50	156.3	153.8	108.2	139.4	27.1	19.4
	350	200.8	188.4	140.0	176.4	32.2	18.2
5	2.5	<i>n.d.</i>	33.9	26.9	30.4	-	-
	10	99.9	102.1	93.8	98.6	4.3	4.4
	50	153.6	145.3	112.0	137.0	22.0	16.1
	350	184.5	184.7	149.1	172.8	20.5	11.9
25	2.5	34.5	36.3	31.0	33.9	2.7	7.9
	10	97.2	111.0	100.6	102.9	7.2	7.0
	50	142.1	153.7	106.1	134.0	24.8	18.5
	350	191.6	152.1	123.1	155.6	34.4	22.1
75	2.5	27.8	42.9	36.8	35.8	7.6	21.2
	10	92.3	98.9	90.0	93.7	4.6	4.9
	50	137.5	128.2	101.1	122.3	19.0	15.5
	350	159.1	174.4	129.2	154.2	23.0	14.9
375	2.5	37.5	32.9	35.7	35.3	2.3	6.5
	10	81.2	82.8	83.0	82.3	1.0	1.2
	50	120.5	107.0	98.5	108.6	11.1	10.2
	350	158.8	159.8	117.9	145.5	23.9	16.4

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè n<2

Taula 29 Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 7- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	26.9	27.6	27.2	-	-
	10	<i>n.d.</i>	71.1	69.8	70.4	-	-
	50	126.3	101.0	105.7	111.0	13.5	12.2
	350	158.7	145.1	142.7	148.8	8.7	5.8
0.1	2.5	34.3	24.6	31.5	30.2	5.0	16.5
	10	78.4	83.9	79.9	80.8	2.8	3.5
	50	100.1	98.3	108.2	102.2	5.3	5.1
	350	154.3	130.7	138.1	141.0	12.1	8.6
0.5	2.5	25.7	29.8	31.4	29.0	2.9	10.2
	10	72.0	63.5	70.1	68.5	4.5	6.5
	50	100.2	113.9	91.0	101.7	11.5	11.3
	350	136.5	153.6	127.6	139.2	13.2	9.5
2.5	2.5	31.6	25.6	29.3	28.8	3.0	10.5
	10	74.3	70.0	73.9	72.7	2.4	3.3
	50	103.5	123.4	101.4	109.4	12.1	11.1
	350	149.6	129.7	149.2	142.8	11.4	8.0
10	2.5	27.2	28.7	30.2	28.7	1.5	5.1
	10	83.7	72.6	70.8	75.7	7.0	9.2
	50	105.1	94.1	80.1	93.1	12.5	13.5
	350	128.8	131.4	124.3	128.2	3.6	2.8

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 7- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	58.1	39.0	40.3	45.8	10.7	23.3
	10	83.0	90.7	82.6	85.5	4.5	5.3
	50	109.0	105.2	105.8	106.6	2.1	1.9
	350	164.7	170.7	161.7	165.7	4.6	2.8
0.1	2.5	37.9	39.9	35.4	37.7	2.3	6.0
	10	78.6	86.5	83.6	82.9	4.0	4.8
	50	109.3	104.2	107.4	107.0	2.6	2.4
	350	156.2	165.6	165.9	162.6	5.5	3.4
0.5	2.5	37.5	40.1	38.9	38.9	1.3	3.4
	10	81.7	84.7	94.8	87.1	6.9	7.9
	50	111.1	107.8	115.5	111.5	3.9	3.5
	350	153.5	160.7	160.5	158.2	4.1	2.6
5	2.5	39.3	41.6	30.7	37.2	5.7	15.4
	10	85.0	86.1	96.5	89.2	6.3	7.1
	50	102.8	101.5	96.1	100.1	3.5	3.5
	350	151.7	155.1	160.5	155.8	4.4	2.8
20	2.5	39.5	35.6	43.6	39.5	4.0	10.2
	10	84.4	85.7	94.9	88.3	5.7	6.5
	50	99.1	90.2	88.7	92.7	5.6	6.1
	350	147.4	147.1	148.0	147.5	0.5	0.3

## Resultats

Taula 30 Estudi d'Inhibició del CYP2A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 7- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	19.3	16.1	17.0	17.5	1.7	9.6
	10	57.9	61.9	54.5	58.1	3.7	6.4
	50	89.1	87.1	89.6	88.6	1.3	1.5
	350	109.8	104.9	112.4	109.1	3.8	3.5
2.5	2.5	13.9	16.3	16.3	15.5	1.4	8.7
	10	51.2	47.3	53.1	50.5	2.9	5.8
	50	78.0	81.9	80.5	80.1	2.0	2.5
	350	94.2	105.9	110.4	103.5	8.4	8.1
10	2.5	17.3	16.8	20.0	18.0	1.7	9.5
	10	49.7	52.5	55.7	52.6	3.0	5.8
	50	72.0	78.4	82.4	77.6	5.2	6.7
	350	93.5	95.3	102.5	97.1	4.8	4.9
50	2.5	20.6	14.3	18.9	17.9	3.3	18.3
	10	50.2	49.7	52.2	50.7	1.3	2.6
	50	71.6	76.0	81.3	76.3	4.9	6.4
	350	97.5	105.4	101.1	101.3	3.9	3.9
250	2.5	10.9	14.5	12.7	12.7	1.8	14.3
	10	44.0	41.3	41.9	42.4	1.4	3.4
	50	67.5	67.6	73.4	69.5	3.3	4.8
	350	88.7	87.8	93.0	89.8	2.8	3.1

Taula 31 Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA

Concentració Ketoprofè $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	46.1	52.2	51.8	50.0	3.4	6.7
	50	179.9	189.5	206.9	192.1	13.7	7.1
	350	272.0	271.2	281.2	274.8	5.6	2.0
50	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	36.3	54.7	75.3	55.4	19.5	35.2
	50	188.4	207.1	217.4	204.3	14.7	7.2
	350	282.3	275.5	285.6	281.1	5.2	1.8
200	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	91.4	91.1	93.4	92.0	1.2	1.3
	50	197.9	208.8	208.5	205.1	6.2	3.0
	350	303.6	281.8	281.8	289.1	12.5	4.3
1250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	143.9	161.8	181.0	162.2	18.5	11.4
	50	214.7	206.1	214.9	211.9	5.0	2.4
	350	278.4	298.2	297.4	291.3	11.2	3.8
5000	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	116.7	111.4	139.2	122.4	14.7	12.0
	50	122.0	126.1	121.4	123.2	2.6	2.1
	350	219.2	217.9	181.2	206.1	21.6	10.5

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	34.9	64.9	55.3	51.7	15.3	29.6
	50	440.5	445.8	441.6	442.6	2.8	0.6
	350	789.2	764.6	735.7	763.2	26.8	3.5
5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	67.2	70.6	86.9	74.9	10.5	14.0
	50	387.9	420.7	447.2	418.6	29.7	7.1
	350	737.9	748.5	775.7	754.1	19.5	2.6
25	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	49.9	76.1	104.7	76.9	27.4	35.6
	50	397.1	438.9	424.4	420.1	21.2	5.0
	350	760.8	674.9	672.2	702.6	50.4	7.2
75	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	50.5	43.2	53.0	48.9	5.1	10.4
	50	336.7	354.8	336.8	342.8	10.4	3.0
	350	655.6	707.5	679.6	680.9	25.9	3.8
375	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	16.6	21.3	29.4	22.4	6.5	28.8
	50	189.4	176.0	192.4	186.0	8.7	4.7
	350	534.5	503.1	535.0	524.2	18.3	3.5

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

## Resultats

Taula 32 Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	<i>n.d.</i>	39.9	41.3	40.6	-	-
	50	185.0	165.6	179.2	176.6	9.9	5.6
	350	293.1	301.1	289.8	294.7	5.8	2.0
0.1	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	42.4	45.2	52.0	46.5	4.9	10.6
	50	158.0	176.3	186.6	173.7	14.5	8.3
	350	292.2	279.4	305.0	292.2	12.8	4.4
0.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	51.6	36.1	41.5	43.0	7.9	18.4
	50	173.3	227.6	195.5	198.8	27.3	13.7
	350	284.9	346.0	291.2	307.4	33.6	10.9
2.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	48.2	50.5	66.1	54.9	9.7	17.7
	50	225.2	242.5	188.8	218.8	27.4	12.5
	350	355.2	315.8	361.0	344.0	24.6	7.2
10	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	63.7	66.1	69.2	66.4	2.8	4.2
	50	205.1	213.1	214.2	210.8	5.0	2.4
	350	304.8	342.0	336.9	327.9	20.2	6.1

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	26.2	31.1	30.1	29.1	2.6	8.9
	50	97.3	99.5	98.4	98.4	1.1	1.1
	350	738.5	773.2	733.7	748.5	21.5	2.9
0.1	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	28.4	31.7	32.3	30.8	2.1	6.8
	50	103.4	104.0	105.9	104.4	1.3	1.3
	350	709.0	771.7	770.4	750.4	35.8	4.8
0.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	33.1	38.4	44.1	38.6	5.5	14.2
	50	112.0	112.1	118.0	114.0	3.4	3.0
	350	717.4	771.4	768.9	752.6	30.4	4.0
5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	42.8	37.8	46.7	42.4	4.5	10.5
	50	114.5	112.3	97.3	108.0	9.3	8.7
	350	733.3	751.3	784.0	756.2	25.7	3.4
20	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	47.6	47.7	53.7	49.7	3.5	7.0
	50	116.3	107.3	102.2	108.6	7.2	6.6
	350	712.1	726.5	730.9	723.2	9.8	1.4

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 33 Estudi d'Inhibició del CYP2C. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	47.0	47.8	41.3	45.3	3.6	7.8
	50	191.1	188.9	192.0	190.7	1.6	0.9
	350	277.6	272.7	283.8	278.0	5.5	2.0
2.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	35.3	34.1	39.8	36.4	3.0	8.3
	50	155.7	167.5	167.2	163.4	6.8	4.1
	350	238.2	267.3	269.2	258.2	17.3	6.7
10	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	30.4	40.3	41.4	37.4	6.0	16.1
	50	147.3	167.5	173.3	162.7	13.6	8.4
	350	239.4	241.0	264.7	248.4	14.2	5.7
50	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	24.3	25.6	30.8	26.9	3.5	12.8
	50	123.5	138.9	148.0	136.8	12.4	9.0
	350	242.1	266.3	253.2	253.9	12.1	4.8
250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	6.7	5.9	6.6	6.4	0.5	7.3
	50	74.3	79.3	80.1	77.9	3.1	4.0
	350	191.7	185.6	203.7	193.7	9.2	4.8

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

'-': no es pot calcular perquè  $n < 2$



## Resultats

**Taula 34 Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA**

Concentració Ketoprofè μM	Concentració testosterona μM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 2-α-hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	6.4	4.5	4.6	5.2	1.0	20.3
	10	98.9	101.1	102.1	100.7	1.6	1.6
	50	122.8	123.3	124.3	123.5	0.8	0.6
	350	<i>n.d.</i>	153.0	156.7	154.8	-	-
50	2.5	5.1	4.7	8.4	6.1	-	-
	10	87.3	95.3	103.6	95.4	8.2	8.6
	50	109.7	123.0	123.3	118.6	7.8	6.6
	350	181.1	152.9	149.3	161.1	17.4	10.8
200	2.5	12.3	12.5	16.4	13.7	-	-
	10	109.1	111.9	113.9	111.6	2.4	2.2
	50	122.7	123.9	116.0	120.9	4.2	3.5
	350	<i>n.d.</i>	153.0	155.6	154.3	-	-
1250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	17.5	17.5	-	-
	10	117.7	136.6	140.6	131.6	12.3	9.3
	50	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	124.1	124.1	-	-
	350	149.5	154.2	163.5	155.7	7.1	4.6
5000	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	83.4	79.7	96.9	86.7	9.1	10.5
	50	20.4	<i>n.d.</i>	12.6	16.5	-	-
	350	31.2	30.9	23.6	28.6	4.3	15.1

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè n<2

Concentració Ketamina μM	Concentració testosterona μM	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 2-α-hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	21.5	29.3	17.5	22.7	6.0	26.5
	10	90.9	106.2	100.7	99.3	7.8	7.8
	50	305.4	305.6	298.1	303.0	4.3	1.4
	350	470.8	460.2	444.3	458.4	13.3	2.9
5	2.5	<i>n.d.</i>	15.7	12.2	13.9	-	-
	10	100.3	109.6	105.4	105.1	4.7	4.4
	50	269.9	285.6	299.3	284.9	14.7	5.1
	350	447.0	458.9	477.3	461.0	15.3	3.3
25	2.5	4.6	7.3	2.6	4.8	2.3	48.4
	10	68.7	84.0	89.7	80.8	10.8	13.4
	50	261.7	288.7	281.0	277.1	13.9	5.0
	350	461.7	402.0	407.5	423.8	33.0	7.8
75	2.5	<i>n.d.</i>	1.3	<i>n.d.</i>	1.3	-	-
	10	54.2	50.8	51.4	52.1	1.8	3.5
	50	214.9	226.6	219.1	220.2	5.9	2.7
	350	386.6	426.2	404.9	405.9	19.8	4.9
375	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	12.5	13.0	15.6	13.7	1.7	12.1
	50	108.0	102.4	113.8	108.1	5.7	5.3
	350	304.9	305.8	289.7	300.1	9.0	3.0

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè n<2

Taula 35 Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 2- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	<i>n.d.</i>	36.1	35.2	35.6	-	-
	50	113.8	101.3	107.1	107.4	6.2	5.8
	350	160.3	162.8	153.9	159.0	4.6	2.9
0.1	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	37.5	40.0	43.9	40.5	3.2	8.0
	50	95.6	104.4	112.8	104.2	8.6	8.3
	350	159.0	146.8	160.5	155.4	7.5	4.8
0.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	38.0	29.9	35.0	34.3	4.1	11.9
	50	101.7	121.5	98.4	107.2	12.5	11.6
	350	154.5	184.1	153.9	164.1	17.3	10.5
2.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	38.5	38.8	46.5	41.3	4.5	11.0
	50	120.2	142.2	110.7	124.4	16.2	13.0
	350	186.2	170.1	199.6	185.3	14.7	8.0
10	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	45.3	45.9	47.9	46.4	1.4	2.9
	50	120.9	119.7	106.0	115.5	8.3	7.2
	350	164.9	189.3	187.3	180.5	13.6	7.5

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 2- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	17.8	23.6	21.0	20.8	2.9	14.0
	50	55.7	55.8	54.9	55.5	0.5	0.9
	350	452.1	471.7	448.6	457.5	12.4	2.7
0.1	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	18.8	20.2	20.5	19.8	0.9	4.7
	50	58.3	57.7	60.3	58.8	1.4	2.4
	350	434.1	471.9	469.7	458.6	21.3	4.6
0.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	21.4	23.6	27.1	24.1	2.9	11.9
	50	62.4	62.3	68.5	64.4	3.5	5.5
	350	440.1	470.0	468.5	459.5	16.9	3.7
5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	25.9	24.2	29.1	26.4	2.5	9.4
	50	64.2	62.6	56.2	61.0	4.2	6.9
	350	447.4	460.9	477.4	461.9	15.0	3.3
20	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	26.5	27.1	30.0	27.8	1.8	6.6
	50	64.8	59.5	57.3	60.5	3.8	6.4
	350	438.7	445.2	447.7	443.9	4.6	1.0

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

## Resultats

Taula 36 Estudi d'Inhibició del CYP2C11. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 2- $\alpha$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	38.2	39.7	35.3	37.8	2.2	5.9
	50	119.5	117.5	120.4	119.1	1.5	1.3
	350	160.0	155.1	161.9	159.0	3.5	2.2
2.5	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	19.8	17.2	21.1	19.4	2.0	10.1
	50	81.6	86.1	86.6	84.7	2.7	3.2
	350	115.2	129.0	132.4	125.5	9.2	7.3
10	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	15.2	19.1	19.9	18.1	2.5	13.8
	50	75.5	86.5	90.4	84.1	7.7	9.2
	350	116.2	116.2	129.3	120.6	7.6	6.3
50	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	7.2	7.6	8.7	7.8	0.8	10.2
	50	60.0	68.2	72.2	66.8	6.2	9.3
	350	116.0	127.4	122.0	121.8	5.7	4.7
250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	10	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-	-
	50	28.3	30.1	31.2	29.9	1.5	5.0
	350	85.3	81.8	92.6	86.6	5.5	6.3

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

'-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Taula 37 Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb KT i amb KTA

Concentració Ketoprofè $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6- $\beta$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	39.1	34.5	37.6	37.1	2.4	6.4
	10	348.5	362.8	364.7	358.6	8.9	2.5
	50	685.9	693.4	727.0	702.1	21.9	3.1
	350	813.9	811.8	888.9	838.2	43.9	5.2
50	2.5	25.6	30.4	30.0	28.7	2.7	9.4
	10	324.5	306.6	341.7	324.3	17.5	5.4
	50	606.5	644.7	684.5	645.2	39.0	6.1
	350	785.4	780.0	826.2	797.2	25.3	3.2
200	2.5	24.8	24.6	28.9	26.1	2.5	9.4
	10	294.3	285.2	316.8	298.7	16.3	5.4
	50	609.5	591.4	612.4	604.5	11.4	1.9
	350	735.7	752.6	821.2	769.8	45.3	5.9
1250	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8.0	8.0	-	-
	10	150.0	182.0	174.7	168.9	16.7	9.9
	50	444.2	387.6	410.0	413.9	28.5	6.9
	350	657.6	672.6	783.8	704.7	69.0	9.8
5000	2.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.2	2.2	-	-
	10	54.0	54.8	65.9	58.2	6.7	11.4
	50	156.2	129.1	142.1	142.5	13.6	9.5
	350	361.1	403.3	388.5	384.3	21.4	5.6

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Ketamina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6- $\beta$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	55.4	64.5	37.4	52.4	13.8	26.3
	10	322.8	389.3	322.0	344.7	38.7	11.2
	50	1281.0	1290.3	585.1	1052.2	404.5	38.4
	350	1822.0	1757.2	835.3	1471.5	551.9	37.5
5	2.5	<i>n.d.</i>	53.9	33.9	43.9	-	-
	10	366.6	397.4	333.1	365.7	32.2	8.8
	50	1161.9	1167.1	602.1	977.1	324.7	33.2
	350	1687.7	1743.6	903.4	1444.9	469.8	32.5
25	2.5	43.9	49.2	29.4	40.8	10.2	25.1
	10	316.9	350.6	307.5	325.0	22.7	7.0
	50	1094.4	1209.6	529.9	944.6	363.7	38.5
	350	1715.7	1459.0	770.4	1315.0	488.8	37.2
75	2.5	18.6	48.5	29.4	32.2	15.2	47.2
	10	268.1	263.2	228.5	253.3	21.6	8.5
	50	959.2	959.3	476.9	798.5	278.5	34.9
	350	1427.1	1583.6	746.7	1252.5	444.9	35.5
375	2.5	12.9	13.5	7.3	11.2	3.4	30.5
	10	123.1	115.2	120.6	119.6	4.0	3.4
	50	597.6	532.1	282.6	470.8	166.2	35.3
	350	<i>n.d.</i>	1200.1	568.6	884.4	-	-

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

## Resultats

**Taula 38 Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubacions amb BN i amb FEN**

Concentració Buprenorfina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6- $\beta$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	<i>n.d.</i>	40.3	57.8	49.0	-	-
	10	<i>n.d.</i>	304.4	296.9	300.7	-	-
	50	879.5	702.5	734.4	772.1	94.4	12.2
	350	1143.2	972.2	927.6	1014.3	113.8	11.2
0.1	2.5	56.2	51.5	72.0	59.9	10.7	17.9
	10	334.0	337.5	336.0	335.8	1.7	0.5
	50	754.5	707.0	741.5	734.3	24.5	3.3
	350	1119.4	878.2	933.0	976.9	126.4	12.9
0.5	2.5	38.4	47.6	<i>n.d.</i>	43.0	-	-
	10	316.7	242.6	249.6	269.6	40.9	15.2
	50	765.2	775.3	655.7	732.1	66.3	9.1
	350	1052.4	1040.8	878.8	990.7	97.0	9.8
2.5	2.5	39.0	17.6	26.7	27.8	-	-
	10	246.2	209.8	213.2	223.0	20.1	9.0
	50	689.5	799.0	648.8	712.4	77.7	10.9
	350	1040.9	950.5	1043.8	1011.7	53.1	5.2
10	2.5	<i>n.d.</i>	0.7	<i>n.d.</i>	0.7	-	-
	10	106.5	93.4	92.2	97.4	7.9	8.2
	50	622.2	508.5	435.0	521.9	94.3	18.1
	350	991.3	930.6	901.4	941.1	45.9	4.9

*n.d.*: pic cromatogràfic no detectable

-': no es pot calcular perquè  $n < 2$

Concentració Fentanil $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6- $\beta$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	67.3	43.1	41.4	50.6	14.5	28.7
	10	226.0	252.6	237.3	238.6	13.4	5.6
	50	545.6	533.8	548.9	542.8	7.9	1.5
	350	1376.3	1408.5	1434.0	1406.3	28.9	2.1
0.1	2.5	42.8	39.3	43.6	41.9	2.3	5.4
	10	224.4	256.5	254.6	245.2	18.0	7.4
	50	551.1	528.1	560.9	546.7	16.8	3.1
	350	1290.0	1375.2	1482.1	1382.4	96.2	7.0
0.5	2.5	40.9	44.3	42.2	42.5	1.7	4.0
	10	216.0	252.1	281.2	249.8	32.7	13.1
	50	559.3	537.5	601.7	566.2	32.6	5.8
	350	1260.5	1318.0	1431.7	1336.7	87.1	6.5
5	2.5	35.7	41.5	25.7	34.3	8.0	23.2
	10	245.1	208.2	269.7	241.0	31.0	12.9
	50	528.4	516.1	487.1	510.5	21.2	4.2
	350	1251.5	1261.4	1411.0	1308.0	89.3	6.8
20	2.5	26.0	23.2	35.3	28.2	6.3	22.5
	10	202.4	205.1	209.7	205.7	3.7	1.8
	50	484.2	441.2	460.6	462.0	21.5	4.7
	350	1160.5	1179.6	1283.9	1208.0	66.5	5.5

Taula 39 Estudi d'Inhibició del CYP3A1/2. Valors d'Activitat (Velocitat). Incubació amb XYL

Concentració Xilacina $\mu\text{M}$	Concentració testosterona $\mu\text{M}$	Velocitat (pmol/mg proteïna/min) 6- $\beta$ -hidroxitestosterona					
		replicat 1	replicat 2	replicat 3	mitjana	SD	CV(%)
0	2.5	35.5	25.0	24.2	28.2	6.3	22.5
	10	204.3	213.3	194.3	204.0	9.5	4.7
	50	588.2	572.8	613.8	591.6	20.7	3.5
	350	717.4	692.1	793.3	734.3	52.7	7.2
2.5	2.5	32.3	36.0	35.8	34.7	2.1	6.1
	10	192.8	183.9	197.0	191.2	6.7	3.5
	50	525.4	537.4	558.2	540.3	16.6	3.1
	350	673.7	740.6	827.4	747.2	77.1	10.3
10	2.5	36.6	35.0	41.2	37.6	3.2	8.6
	10	169.7	185.3	189.8	181.6	10.5	5.8
	50	482.8	514.4	553.1	516.8	35.2	6.8
	350	669.0	657.7	768.6	698.4	61.1	8.7
50	2.5	39.6	27.1	38.0	34.9	6.8	19.4
	10	152.3	156.2	165.3	157.9	6.6	4.2
	50	409.8	435.0	484.9	443.3	38.2	8.6
	350	646.2	696.7	727.1	690.0	40.8	5.9
250	2.5	11.2	16.8	14.6	14.2	2.8	19.6
	10	86.1	74.8	82.9	81.3	5.8	7.2
	50	251.1	252.6	280.4	261.4	16.5	6.3
	350	480.2	464.0	544.7	496.3	42.7	8.6

### 7.3.1 Determinació de la $K_{m,app}$ i Càlcul del Quocient $K_{m,app}/V_{max}$

Els resultats de les estimacions dels paràmetres  $K_m$  ( $K_{m,app}$ ),  $V_{max}$  ( $V_{max,app}$ ), i els seus quocients respectius ( $K_{m,app}/V_{max,app}$ ) es mostren a la Taula 40.

## Resultats

**Taula 40** Paràmetres Cinètics  $K_{m,app}$  ( $\mu\text{M}$ ) i  $V_{max,app}$  (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP1A1/2 i CYP2B1/2. Càlcul del Quocient  $K_{m,app}/V_{max}$

CYP1A1/2									
FEN	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	0.187	0.155	0.149	22.500	21.444	21.014	0.008	0.007	0.007
0.1	0.032	0.071	0.046	20.625	23.394	20.843	0.002	0.003	0.002
0.5	0.056	0.053	0.066	22.275	22.455	21.543	0.003	0.002	0.003
5	0.027	0.022	0.063	19.422	19.596	19.656	0.001	0.001	0.003
20	0.019	0.010	0.012	16.689	16.793	16.813	0.001	0.001	0.001
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

CYP2B1/2									
KT	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	2.813	4.096	3.070	9.740	11.585	9.992	0.289	0.354	0.307
50	5.096	4.419	4.028	11.866	11.632	11.467	0.429	0.380	0.351
200	3.635	2.423	2.718	9.367	9.031	8.935	0.388	0.268	0.304
1250	5.528	4.063	4.589	8.027	7.575	8.097	0.689	0.536	0.567
5000	6.323	9.803	4.537	4.974	5.181	4.526	1.271	1.892	1.002
KTA	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	6.050	5.529	6.306	6.163	6.000	6.166	0.982	0.921	1.023
5	6.430	6.245	6.825	5.395	5.154	5.446	1.192	1.212	1.253
25	9.189	11.478	8.103	4.739	5.372	4.501	1.939	2.136	1.800
75	11.589	14.228	15.402	4.222	4.596	4.616	2.745	3.095	3.336
375	16.717	24.821	20.426	3.679	4.466	4.035	4.544	5.558	5.063
FEN	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	7.493	8.316	8.369	10.354	9.481	10.840	0.724	0.877	0.772
0.1	10.478	9.357	10.944	10.218	9.468	9.958	1.026	0.988	1.099
0.5	14.135	10.639	13.060	11.858	9.530	10.023	1.192	1.116	1.303
5	6.516	5.458	7.608	8.507	8.357	9.524	0.766	0.653	0.799
20	7.743	8.342	7.462	7.611	8.493	8.884	1.017	0.982	0.840
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

FEN: Fentanil, KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina.

**Taula 41 Paràmetres Cinètics  $K_{m,app}$  ( $\mu\text{M}$ ) i  $V_{max,app}$  (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP2D1 i CYP3A1/2. Càlcul del Quocient  $K_{m,app}/V_{max}$**

CYP2D1									
KTA	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	8.777	8.725	8.671	194.529	189.566	189.068	0.045	0.046	0.046
5	7.329	7.045	8.336	186.282	181.353	183.952	0.039	0.039	0.045
25	8.188	8.661	8.989	178.486	185.174	182.841	0.046	0.047	0.049
75	6.825	9.389	8.739	174.300	174.948	172.185	0.039	0.054	0.051
375	22.027	16.738	20.429	172.539	158.255	165.633	0.128	0.106	0.123
FEN	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	4.368	4.719	4.203	299.326	296.021	294.385	0.015	0.016	0.014
0.1	0.437	0.403	1.247	283.554	276.037	277.402	0.002	0.001	0.004
0.5	0.003	0.748	0.617	275.964	283.322	284.436	1.1E-05	0.003	0.002
5	2.082	3.695	3.369	281.197	285.112	285.125	0.007	0.013	0.012
20	5.793	5.296	4.817	290.080	294.748	290.818	0.020	0.018	0.017
XYL	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	7.200	7.200	7.800	158.800	154.500	159.700	0.045	0.047	0.049
2.5	8.100	8.100	8.700	156.700	153.200	154.400	0.052	0.053	0.056
10	8.900	9.500	10.100	150.000	155.700	158.400	0.059	0.061	0.064
50	15.000	14.600	14.900	136.100	138.400	142.300	0.110	0.105	0.105
250	24.400	32.100	32.400	103.800	109.300	107.400	0.235	0.294	0.302
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

CYP3A1/2									
KT	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	16.355	15.655	17.681	871.876	870.773	950.448	0.019	0.018	0.019
50	18.546	18.383	17.431	830.684	840.344	886.150	0.022	0.022	0.020
200	18.155	20.007	20.621	791.233	806.289	870.802	0.023	0.025	0.024
1250	36.052	39.894	54.341	732.739	740.771	899.495	0.049	0.054	0.060
5000	92.041	168.750	122.785	455.285	596.597	523.140	0.202	0.283	0.235
BN	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	<i>m.p.</i>	25.900	22.300	<i>m.p.</i>	1050.200	1006.200	<i>m.p.</i>	0.025	0.022
0.1	29.200	18.700	19.700	1209.200	940.200	999.500	0.024	0.020	0.020
0.5	26.600	30.100	25.100	1142.400	1153.700	951.800	0.023	0.026	0.026
2.5	35.700	27.200	43.000	1153.900	1071.000	1178.000	0.031	0.025	0.037
10	50.900	67.600	82.300	1150.700	1118.600	1116.300	0.044	0.060	0.074
XYL	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	23.745	22.579	28.292	791.378	761.210	880.881	0.030	0.030	0.032
2.5	25.040	30.042	34.372	738.375	815.996	915.312	0.034	0.037	0.038
10	29.676	25.090	30.310	735.303	721.306	846.607	0.040	0.035	0.036
50	37.388	40.221	35.585	715.519	778.292	806.604	0.052	0.052	0.044
250	61.416	58.889	66.745	564.126	542.998	649.237	0.109	0.108	0.103
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

*m.p.*: mostra perduda a l'anàlisi.

KTA: Ketamina, FEN: Fentanil, XYL: Xilacina, KT: Ketoprofè, BN: Buprenorfina



## Resultats

**Taula 42** Paràmetres Cinètics  $K_{m,app}$  ( $\mu\text{M}$ ) i  $V_{max,app}$  (pmol/mg proteïna/min) per les Isoformes CYP2C11 i CYP2C. Càlcul del Quocient  $K_{m,app}/V_{max}$

CYP2C11									
KT	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	9.456	9.777	10.004	153.015	156.298	159.475	0.062	0.063	0.063
50	18.671	10.583	8.619	180.280	156.981	152.688	0.104	0.067	0.056
200	7.441	7.581	7.163	149.796	154.494	152.130	0.050	0.049	0.047
1250	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	5.640	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	161.231	<i>m.p.</i>	<i>m.p.</i>	0.035
5000	2.2E-04	<i>m.p.</i>	9.7E-05	44.871	<i>m.p.</i>	44.330	4.8.10 <sup>-6</sup>	<i>m.p.</i>	2.2.10 <sup>-6</sup>
KTA	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	40.529	35.103	35.710	529.854	508.840	493.597	0.076	0.069	0.072
5	41.597	39.203	40.797	499.185	510.211	534.877	0.083	0.077	0.076
25	57.308	34.197	35.899	540.187	449.727	455.864	0.106	0.076	0.079
75	58.853	68.478	63.514	453.535	512.289	480.319	0.130	0.134	0.132
375	167.612	187.935	133.726	451.407	470.547	401.098	0.371	0.399	0.333
XYL	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	30.830	29.207	32.378	178.093	172.086	181.105	0.173	0.170	0.179
2.5	38.357	45.341	44.594	130.611	148.422	151.514	0.294	0.305	0.294
10	47.696	36.374	40.684	134.309	132.090	147.620	0.355	0.275	0.276
50	80.069	75.571	62.136	143.687	156.361	145.636	0.557	0.483	0.427
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

*m.p.*: mostra perduda a l'anàlisi.

CYP2C									
KT	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	42.882	37.475	35.474	309.847	305.744	318.041	0.138	0.123	0.112
50	45.866	33.388	28.537	325.394	310.475	316.287	0.141	0.108	0.090
200	32.117	25.612	3.222	330.734	306.158	93.663	0.097	0.084	0.034
1250	14.734	14.596	11.815	288.421	299.502	297.557	0.051	0.049	0.040
5000	17.364	18.377	8.098	212.596	214.690	174.483	0.082	0.086	0.046
KTA	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	70.475	60.580	58.453	959.111	906.961	870.189	0.073	0.067	0.067
5	71.818	63.450	58.486	894.461	891.692	912.808	0.080	0.071	0.064
25	76.411	47.429	45.337	933.477	778.885	766.384	0.082	0.061	0.059
75	77.274	82.896	82.251	804.930	880.217	843.480	0.096	0.094	0.098
375	171.434	171.568	158.608	797.657	750.521	778.216	0.215	0.229	0.204
XYL	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app}/V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	38.095	37.203	41.362	312.603	306.449	322.511	0.122	0.121	0.128
2.5	43.675	48.979	47.525	271.547	308.367	308.693	0.161	0.159	0.154
10	50.566	37.697	42.611	277.082	271.440	300.543	0.182	0.139	0.142
50	74.633	72.339	55.996	294.906	322.957	296.092	0.253	0.224	0.189
250	142.482	118.178	139.087	270.410	249.182	285.354	0.527	0.474	0.487
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

KT: Ketoprfè, KTA: Ketamina, XYL: Xilacina

**Taula 43** Paràmetres Cinètics  $K_{m,app}$  ( $\mu M$ ) i  $V_{max,app}$  (pmol/mg proteïna/min) pel CYP2A1/2. Càlcul del Quocient  $K_{m,app}/V_{max}$

CYP2A1/2									
KT	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	8.782	8.369	8.689	75.779	76.422	77.678	0.116	0.110	0.112
50	8.398	8.859	8.745	71.427	73.538	73.368	0.118	0.120	0.119
200	7.068	6.717	6.486	70.225	71.465	70.786	0.101	0.094	0.092
1250	4.441	2.476	8.106	66.389	65.060	73.636	0.067	0.038	0.110
5000	5.464	7.839	6.485	53.957	58.853	55.203	0.101	0.133	0.117
XYL	$K_{m,app}$			$V_{max,app}$			$K_{m,app} / V_{max,app}$		
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3	replicat 1	replicat 2	replicat 3
0	10.341	9.120	12.320	111.404	106.658	115.046	0.093	0.086	0.107
2.5	10.408	13.901	13.025	96.441	108.462	110.447	0.108	0.128	0.118
10	10.104	9.672	9.488	93.024	96.723	102.867	0.109	0.100	0.092
50	10.085	13.778	10.446	95.241	105.753	102.258	0.106	0.130	0.102
250	12.755	12.667	14.037	89.911	88.966	96.025	0.142	0.142	0.146
<b>columna 1</b>							<b>columna 2</b>		

KT: Ketoprofè ( $\mu M$ ), XYL: Xilacina ( $\mu M$ )

A continuació, es va realitzar l'estudi estadístic de les dades tal i com s'explica a la secció 6.3.1.

La Taula 44 mostra els 18 tests on es detecten diferències estadísticament significatives, que són: KT amb CYP2B1/2, CYP3A1/2, CYP2C11, CYP2C i CYP2A1/2; KTA amb CYP2B1/2, CYP2D1, CYP2C11 i CYP2C; BN amb CYP3A1/2; FEN amb CYP1A1/2, CYP2B1/2 i CYP2D1; i XYL amb CYP2D1, CYP3A1/2, CYP2C11, CYP2C i CYP2A1/2. A la mateixa taula s'indica el tipus de test estadístic aplicat.

**Taula 44 Estadística. Comparació dels Quocients  $K_{m,app}/V_{max}$  Entre les Diferents Concentracions de Fàrmac per a Totes les Isoformes CYP450**

CYP450	Fàrmac				
	KT	KTA	BN	FEN	XYL
CYP1A1/2				KW	
CYP2B1/2	KW	****		***	
CYP2D1		KW		****	KW
CYP3A1/2	KW		KW		KW
CYP2C11	**	KW			***
CYP2C	*	KW			KW
CYP2A1/2	*				**
CYP2E1					

KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, BN: Buprenorfina, FEN: Fentanil, XYL: Xilacina

**TEST PARAMÈTRIC. Anàlisi de la variància d'una via,**

\*  $p < 0,05$ . Diferències estadísticament significatives entre els valors mitjos

\*\*  $p < 0,005$ . Diferències estadísticament significatives entre els valors mitjos

\*\*\*  $p < 0.0005$ . Diferències estadísticament significatives entre els valors mitjos

\*\*\*\*  $p < 0.000005$ . Diferències estadísticament significatives entre els valors mitjos

**TEST NO PARAMÈTRIC: Kruskal-Wallis**

K-W, Diferències estadísticament significatives entre els valors mitjos

### 7.3.2 Càlcul de l'IC<sub>50</sub>

L'equació hiperbòlica descrita a la secció 6.3.2 es va utilitzar per estimar els valors d'IC<sub>50</sub> en les 18 relacions fàrmac-isoforma CYP450 indicades en la secció 0.

Per aquest càlcul es van utilitzar les concentracions de substrate específic més properes a la  $K_m$  de cada isoforma: 5  $\mu\text{M}$  per EROD i PROD, 25  $\mu\text{M}$  per DEX, i 10  $\mu\text{M}$  per TST.

La Taula 45 mostra els valors obtinguts d'IC<sub>50</sub>, i les representacions gràfiques es mostren a la Figura 32.

Taula 45 Valor d'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP450 Susceptibles d'Interaccionar per Inhibició segons el Test Estadístic

<b>CYP1A1/2</b>	FEN	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>						
	0	100							
	0.1	99.9							
	0.5	100.0							
	5	86.1							
	20	72.5	49.0						
<b>CYP2B1/2</b>	KT	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	KTA	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	FEN	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>
	0	100		0	100.0		0	100.0	
	50	97.5		5	82.3		0.1	99.1	
	200	96.0		25	67.3		0.5	87.0	
	1250	71.6		75	48.0		5	96.8	
	5000	37.9	3112.6	375	26.3	72.9	20	84.5	142.2
<b>CYP2D1</b>	KTA	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	FEN	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	XYL	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>
	0	100		<i>m.p.</i>			0	100.0	
	5	99.1					2.5	90.9	
	25	95.3					10	84.4	
	75	92.0					50	56.9	
	375	64.4	693.8				250	27.9	75.0
<b>CYP3A1/2</b>	KT	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	BN	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	XYL	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>
	0	100		0	100.0		0	100.0	
	50	90.4		0.1	111.7		2.5	93.7	
	200	83.3		0.5	89.7		10	89.0	
	1250	47.1		2.5	74.2		50	75.6	
	5000	16.2	1058.7	10	32.4	5.5	250	39.9	162.4
<b>CYP2C11</b>	KT	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	KTA	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	XYL	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>
	0	100		0	100.0		0	100.0	
	50	96.079		5	94.02		2.5	70.6	
	200	97.878		25	91.45		10	70.6	
	1250	100.53		75	72.65		50	56.1	
	5000	13.338	3117.9	375	35.67	209.5	250	25.1	62.9
<b>CYP2C</b>	KT	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	KTA	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	XYL	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>
	<i>no c.</i>			0	100.0		0	100.0	
				5	144.8		2.5	80.3	
				25	148.6		10	82.4	
				75	94.5		50	59.3	
375				43.4	84.3	250	14.1	59.8	
<b>CYP2A1/2</b>	KT	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>	XYL	Activitat (%)	IC <sub>50</sub>			
	0	100		0	100.0				
	50	95.7		2.5	87.0				
	200	104.2		10	90.5				
	1250	105.6		50	87.2				
	5000	81.3	38921.1	250	73.0	769.7			

KT: Ketoprofè ( $\mu\text{M}$ ), KTA: Ketamina ( $\mu\text{M}$ ), BN: Buprenorfina ( $\mu\text{M}$ ), FEN: Fentanil ( $\mu\text{M}$ ), XYL: Xilacina ( $\mu\text{M}$ )

IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ): concentració d'inhibidor que disminueix l'activitat màxima d'un enzim a la meitat

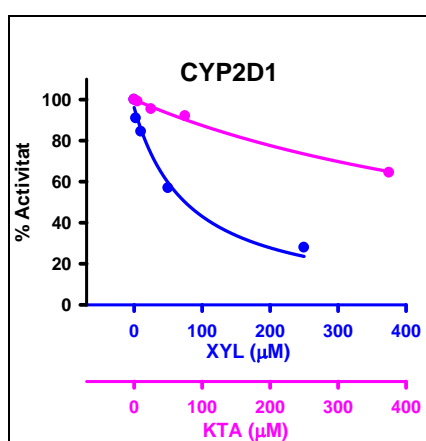
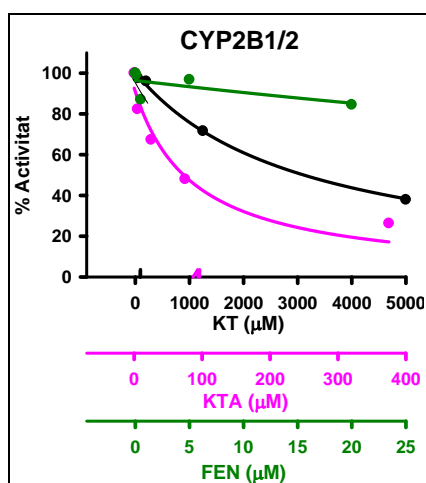
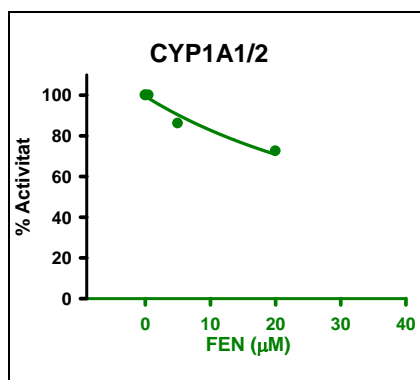
Activitat (%): percentatge d'activitat relatiu a l'activitat control (concentració 0 de fàrmac)

*m.p.*: les mostres de concentració Fentanil zero es van perdre en l'experiment.

*no c.*: no es pot calcular. Ajustat erroni de l'equació utilitzant el SigmaPlot

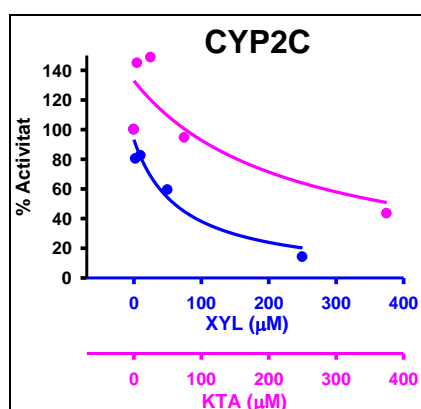
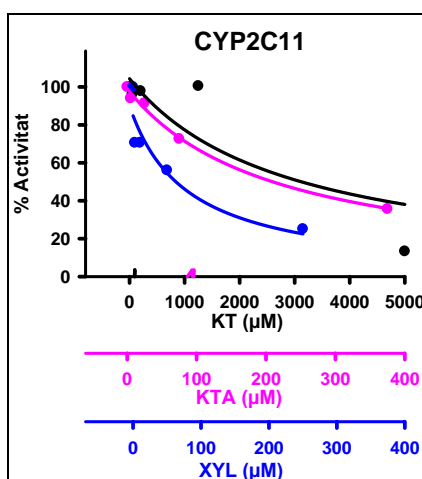
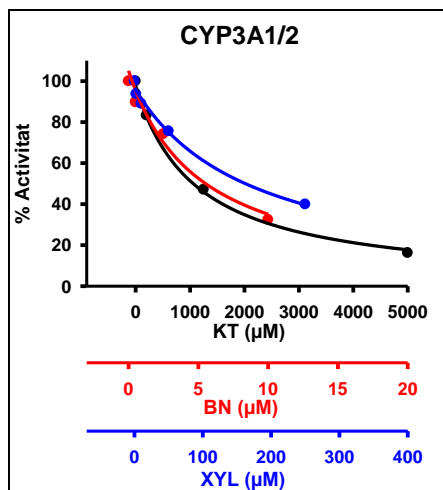
## Resultats

Figura 32 Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP1A1/2, CYP2B1/2 i CYP2D1



*FEN: Fentanil, KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, XYL: Xilacina*

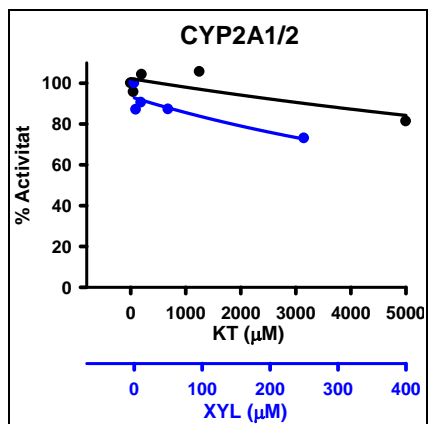
Figura 33 Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb els CYP3A1/2, CYP2C11 i CYP2C



BN: Buprenorfina, XYL: Xilacina, KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina

## Resultats

Figura 34 Representacions Gràfiques pel Càlcul de l'IC<sub>50</sub> dels Fàrmacs amb el CYP2A1/2



### 7.3.3 *Càlcul de la $K_i$ Mètode SNLR*

A la Taula 46, a la Taula 47 i a la Taula 48 apareixen els valors de  $K_i$  de les 18 relacions Fàrmac-CYP susceptibles d'establir una relació d'inhibició. El valor de  $K_i$  es va determinar ajustant els models cinètics als valors mitjos de les activitats enzimàtiques ( $n=3$ ), mitjançant SNLR i utilitzant el software WinNonlin. Les equacions d'aquests models són les descrites a les seccions 6.3.3 i 6.3.4.

En funció dels resultats obtinguts a la secció 7.2.2., es van aplicar els models d'inhibició derivats de la equació de M-M en les següents relacions: KT-(CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2); KTA-(CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP2D1); BN-CYP3A1/2; FEN-(CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2D1); i XYL-(CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11, CYP2D1 i CYP3A1/2). I els models derivats de la equació de Hill en les relacions: KT-(CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2); KTA-(CYP2C i CYP2C11); BN-CYP3A1/2; FEN-(CYP1A1/2); XYL-(CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2).



## Resultats

**Taula 46** Valors de la  $K_i$  i dels Paràmetres Cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$  per cada Tipus d'Inhibició. Model de M-M. KT i KTA

Fàrmac	CYP450	Inhibició Competitiva					Inhibició No Competitiva					Inhibició Acompetitiva					Inhibició Mixta					
		Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	
KT	CYP2B1/2	$V_{max}$	10.1	0.6	6.3	65.9	68.9	10.8	0.6	5.4	57.9	60.9	10.9	0.7	6.0	60.0	63.0	10.7	0.6	6.0	60.1	64.0
		$K_m$	2.7	0.9	31.5			3.8	0.8	20.9			4.0	0.9	22.9			3.7	0.9	24.2		
		$K_i$	378.9	138.5	36.5			3052.2	593.5	19.4			2463.7	525.0	21.3			2107.4	2004.8	95.1		
	CYP2A1/2	$V_{max}$	69.9	2.6	3.8	137.4	140.4	73.8	2.5	3.4	128.9	131.9	74.2	2.6	3.5	129.0	132.0	73.9	2.7	3.7	130.8	134.8
		$K_m$	6.7	1.3	19.3			7.6	1.0	13.3			8.0	1.1	13.5			7.8	1.2	15.8		
		$K_i$	5468.5	3832.5	70.1			18013.5	5777.9	32.1			15502.7	5050.1	32.6			29063.8	70266.3	241.8		
	CYP2C	$V_{max}$	266.7	15.6	5.8	721.9	728.2	278.8	17.3	6.2	718.7	725.0	283.5	18.2	6.4	717.9	724.2	282.5	18.9	6.7	720.1	728.5
		$K_m$	20.6	5.1	24.8			21.6	4.7	21.6			22.6	4.9	21.6			22.5	5.6	24.8		
		$K_i$	18103.6	34530.8	190.7			23514.2	15628.5	66.5			16414.0	9769.5	59.5			94069.8	982243.8	1044.2		
	CYP2C11	$V_{max}$	151.5	14.6	9.6	583.8	589.6	158.3	10.0	6.3	543.0	548.8	162.8	10.1	6.2	537.8	543.6	162.8	10.4	6.4	540.3	548.0
$K_m$		3.3	2.0	60.2			7.2	1.8	24.7			8.1	1.9	23.8			8.0	2.0	25.2			
$K_i$		50.0	37.3	74.7			4553.6	1491.3	32.8			3654.3	1136.5	31.1			49876.0	709540.5	1422.6			
CYP3A1/2	$V_{max}$	851.7	19.4	2.3	679.4	685.5	911.6	23.7	2.6	688.8	694.9	916.7	31.1	3.4	712.7	718.8	877.1	18.6	2.1	664.4	672.5	
	$K_m$	14.2	1.5	10.6			21.1	1.9	9.2			22.8	2.7	11.7			18.0	1.5	8.3			
	$K_i$	291.7	44.7	15.3			3030.7	350.6	11.6			2528.1	375.6	14.9			702.7	147.2	20.9			
KTA	CYP2B1/2	$V_{max}$	5.1	0.3	5.7	26.4	29.4	5.6	0.4	7.3	33.6	36.6	5.7	0.5	8.9	38.1	41.1	5.3	0.4	8.0	35.2	39.2
		$K_m$	5.1	1.1	22.2			7.6	1.7	21.9			8.3	2.1	25.6			6.6	1.7	25.8		
		$K_i$	41.8	11.7	28.1			262.0	67.1	25.6			197.2	60.0	30.4			109.7	75.6	69.0		
	CYP2C	$V_{max}$	869.6	20.8	2.4	508.3	513.8	920.9	26.1	2.8	520.4	516.2	931.1	34.1	3.7	536.6	542.0	881.8	23.1	2.6	508.9	516.2
		$K_m$	55.7	4.7	8.4			69.9	5.8	8.4			76.4	7.9	10.3			60.7	5.1	8.4		
		$K_i$	130.4	20.1	15.4			631.4	91.3	14.5			519.4	98.4	18.9			193.7	53.3	27.5		
	CYP2C11	$V_{max}$	497.6	6.8	1.4	518.0	524.0	532.3	12.0	2.3	566.3	572.3	536.3	17.0	3.2	595.5	601.5	505.3	8.1	1.6	526.3	534.3
		$K_m$	34.4	1.9	5.4			47.7	3.3	7.0			52.3	4.9	9.4			39.4	2.2	5.6		
		$K_i$	72.8	6.7	9.1			468.7	52.5	11.2			400.7	63.6	15.9			110.4	17.3	15.7		
	CYP2D1	$V_{max}$	179.5	3.3	1.8	159.1	162.1	186.5	3.9	2.1	158.7	161.7	186.3	4.2	2.3	158.7	161.7	184.3	3.4	1.9	153.8	157.8
$K_m$		6.9	1.2	17.8			9.3	1.3	14.3			9.5	1.4	15.3			7.9	1.2	14.7			
$K_i$		138.5	55.3	39.9			1831.1	480.7	26.3			1855.4	545.9	29.4			230.0	107.5	46.8			

KT: Ketoprofè ( $\mu\text{M}$ ), KTA: Ketamina ( $\mu\text{M}$ ), BN: Buprenorfina ( $\mu\text{M}$ ), FEN: Fentanil ( $\mu\text{M}$ ), XYL: Xilacina ( $\mu\text{M}$ )

$V_{max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min)

$K_m$ : constant de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )

$K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ )

SD: desviació estàndar

CV(%): coeficient de variació (%)

AIC: criteri estadístic d'Akaike

SBC: criteri estadístic de Schwartz

Taula 47 Valors de la  $K_i$  i dels Paràmetres Cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$  per cada Tipus d'Inhibició. Model del M-M. BN, FEN i XYL

Fàrmac	CYP450	Inhibició Competitiva					Inhibició No Competitiva					Inhibició Acompetitiva					Inhibició Mixta					
		Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	
BN	CYP3A1/2	$V_{max}$	1092.0	21.9	2.0	681.8	687.9	1132.6	30.0	2.7	702.8	708.8	1127.7	33.5	3.0	709.9	715.9	1092.6	25.8	2.4	684.9	692.9
		$K_m$	24.5	2.1	8.5			30.7	2.7	8.9			31.8	3.1	9.6			25.1	2.3	9.1		
		$K_i$	7.1	1.6	22.8			51.1	14.8	29.0			55.2	21.7	39.2			7.6	2.2	28.5		
FEN	CYP1A1/2	$V_{max}$	20.6	0.8	4.0	105.5	108.5	21.7	0.8	3.8	98.4	101.4	21.7	0.8	3.8	98.2	101.2	21.7	0.9	4.0	100.3	104.3
		$K_m$	0.1	0.1	58.4			0.2	0.1	40.9			0.2	0.1	40.8			0.2	0.1	44.8		
		$K_i$	9.1	11.2	123.5			74.5	29.2	39.2			71.7	28.1	39.2			206.3	3996.2	1937.1		
	CYP2B1/2	$V_{max}$	9.4	0.4	4.5	41.9	44.9	9.7	0.4	4.5	39.6	42.6	9.8	0.5	4.6	39.2	42.2	9.4	0.5	5.1	42.3	46.3
		$K_m$	8.0	1.2	14.8			8.5	1.1	13.1			8.9	1.2	13.2			7.8	1.3	16.2		
		$K_i$	58.2	40.7	69.9			149.3	73.1	49.0			107.1	51.9	48.5			154.6	394.7	255.3		
	CYP2D1	$V_{max}$	288.2	8.6	3.0	189.4	192.3	288.5	10.2	3.5	189.5	192.4	288.3	10.2	3.6	189.6	192.4	288.6	10.7	3.7	191.5	195.3
		$K_m$	3.4	1.4	40.2			3.5	1.3	37.9			3.5	1.3	37.9			3.5	1.5	42.1		
		$K_i$	48.6	148.7	305.8			2252.4	17257.8	766.2			3244.7	36812.5	1134.5			293.5	5619.8	1914.9		
XYL	CYP2A1/2	$V_{max}$	101.7	2.3	2.3	129.2	132.2	105.3	2.3	2.2	124.2	127.1	105.6	2.6	2.4	126.3	129.3	104.7	2.5	2.4	125.5	129.5
		$K_m$	9.9	1.1	10.9			11.3	0.9	8.4			11.7	1.0	8.9			10.9	1.1	9.9		
		$K_i$	305.0	128.7	42.2			1351.2	377.0	27.9			1213.9	375.8	31.0			658.5	490.1	74.4		
	CYP2C	$V_{max}$	298.0	6.7	2.3	420.6	426.0	314.4	9.2	2.9	440.7	446.1	316.1	11.6	3.7	455.9	461.3	300.8	7.6	2.5	424.4	431.6
		$K_m$	40.3	3.4	8.4			51.8	4.7	9.2			55.6	6.2	11.1			43.3	3.8	8.8		
		$K_i$	76.8	12.2	15.9			448.7	73.5	16.4			392.9	83.7	21.3			103.7	27.2	26.2		
	CYP2C11	$V_{max}$	155.5	5.4	3.5	549.1	555.4	162.1	6.9	4.2	441.1	446.7	162.2	7.7	4.8	446.1	451.7	157.4	7.2	4.6	441.7	449.2
		$K_m$	27.2	3.2	11.9			41.3	5.4	13.1			44.5	6.3	14.1			38.2	5.7	14.9		
		$K_i$	18.0	4.6	25.3			155.3	45.6	29.4			152.8	56.2	36.8			59.8	35.5	59.3		
	CYP2D1	$V_{max}$	150.6	15.6	10.3	199.8	202.7	159.6	17.8	11.1	200.0	202.8	159.7	18.8	11.8	200.8	203.6	156.3	18.1	11.6	201.2	205.0
		$K_m$	6.8	4.7	69.1			9.5	5.0	52.7			10.2	5.5	54.4			8.2	5.2	62.6		
		$K_i$	26.7	33.4	124.9			262.6	204.8	78.0			243.0	200.8	82.7			52.9	92.6	174.8		
	CYP3A1/2	$V_{max}$	781.8	15.4	2.0	699.1	705.4	829.1	16.8	2.0	697.0	703.3	834.8	21.4	2.6	718.9	725.2	807.2	15.3	1.9	684.2	692.6
		$K_m$	23.8	1.9	8.1			31.0	2.1	6.8			33.4	2.8	8.3			27.5	1.9	7.0		
		$K_i$	56.6	8.6	15.2			369.9	41.7	11.3			316.2	45.5	14.4			120.7	27.6	22.8		

KT: Ketoprofè ( $\mu M$ ), KTA: Ketamina ( $\mu M$ ), BN: Buprenorfina ( $\mu M$ ), FEN: Fentanil ( $\mu M$ ), XYL: Xilacina ( $\mu M$ )  
 $V_{max}$ : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min)  
 $K_m$ : constant de Michaelis-Menten ( $\mu M$ )  
 $K_i$ : constant d'inhibició ( $\mu M$ )

SD: desviació estàndar  
 CV(%): coeficient de variació (%)  
 AIC: criteri estadístic d'Akaike  
 SBC: criteri estadístic de Schwartz

Taula 48 Valors de la  $K_i$  i dels Paràmetres Cinètics  $K_m$  i  $V_{max}$  per cada Tipus d'Inhibició. Model de Hill

Fàrmac	CYP450	Inhibició Competitiva					Inhibició No Competitiva					Inhibició Acompetitiva					
		Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	Valor	SD	CV%	AIC	SBC	
KT	CYP2C	$V_{max}$	252.6	17.8	7.1	722.9	731.3	262.5	18.4	7.0	719.1	727.5	264.9	18.8	7.1	718.1	726.4
		$K_m$	17.6	4.5	25.6			17.7	3.8	21.3			18.0	3.9	21.4		
		$K_i$	23996.0	66090.7	275.4			22343.1	14218.6	63.6			16529.5	9400.7	56.9		
		$\gamma$	1.2	0.2	20.6			1.3	0.3	20.0			1.3	0.3	19.9		
	CYP2C11	$V_{max}$	270.4	196.4	72.6	564.4	572.1	139.6	6.7	4.8	527.6	535.2	142.3	6.7	4.7	524.9	532.5
		$K_m$	95.0	402.1	423.5			5.7	0.9	16.3			6.1	0.9	14.8		
		$K_i$	2068.4	1893.2	91.5			4899.4	1360.7	27.8			4481.0	1209.4	27.0		
		$\gamma$	0.4	0.2	52.1			3.1	0.8	25.3			2.9	0.7	24.8		
	CYP3A1/2	$V_{max}$	860.7	27.5	3.2	681.2	689.3	876.6	26.9	3.1	687.4	695.5	870.2	33.5	3.9	710.4	718.5
$K_m$		14.7	2.0	13.6			18.7	1.8	9.6			19.4	2.3	11.9			
$K_i$		313.6	75.6	24.1			3007.6	339.7	11.3			2618.9	378.3	14.4			
$\gamma$		1.0	0.1	6.9			1.2	0.1	8.4			1.2	0.1	10.5			
KTA	CYP2C	$V_{max}$	785.4	19.9	2.5	496.8	504.0	795.8	16.0	2.0	494.0	501.2	792.9	21.3	2.7	518.3	525.5
		$K_m$	42.1	3.2	7.6			47.9	2.1	4.4			49.7	2.9	5.8		
		$K_i$	85.6	16.4	19.2			627.1	66.6	10.6			589.8	87.6	14.9		
		$\gamma$	1.3	0.1	6.1			1.6	0.1	7.5			1.6	0.2	9.8		
	CYP2C11	$V_{max}$	417.0	48.1	11.5	752.2	760.5	423.4	53.4	12.6	753.1	761.4	502.1	18.9	3.8	593.5	601.5
		$K_m$	33.4	10.0	30.0			37.6	13.8	36.7			43.2	4.4	10.2		
		$K_i$	697.5	212.0	30.4			9595.8	3325.4	34.7			416.8	64.0	15.4		
		$\gamma$	1.1	0.3	30.0			1.1	0.3	31.0			1.2	0.1	8.9		
	BN	CYP3A1/2	$V_{max}$	1026.5	21.4	2.1	671.0	679.0	1076.8	31.6	2.9	698.7	706.7	1057.3	37.8	3.6	708.2
$K_m$			20.7	1.6	7.5			26.8	2.3	8.5			28.3	2.9	10.3		
$K_i$			5.1	1.2	23.1			49.5	13.4	27.1			74.6	35.9	48.1		
$\gamma$			1.3	0.1	6.1			1.2	0.1	7.7			1.1	0.1	8.7		
FEN	CYP1A1/2	$V_{max}$	20.3	1.0	4.8	107.0	111.0	21.4	0.9	4.0	99.5	103.5	21.4	0.9	4.1	99.4	103.4
		$K_m$	0.2	0.1	61.3			0.2	0.1	38.2			0.2	0.1	38.3		
		$K_i$	0.9	2.0	226.7			9.2	3.7	40.0			8.9	3.6	39.7		
		$\gamma$	0.9	2.0	226.7			9.2	3.7	40.0			8.9	3.6	39.7		
XYL	CYP2C	$V_{max}$	273.9	6.3	2.3	409.1	416.3	284.2	7.3	2.6	427.7	434.9	281.8	8.9	3.2	445.2	452.4
		$K_m$	32.2	2.3	7.3			39.9	2.5	6.3			41.1	3.1	7.5		
		$K_i$	50.9	9.7	19.0			446.5	62.3	14.0			428.9	78.6	18.3		
		$\gamma$	1.3	0.1	5.9			1.4	0.1	8.1			1.5	0.1	9.7		
	CYP2C11	$V_{max}$	136.2	4.2	3.1	420.6	428.0	146.3	5.2	3.6	428.8	436.3	145.6	5.7	3.9	434.1	441.6
		$K_m$	23.1	2.6	11.2			31.6	2.8	8.9			32.8	3.1	9.5		
		$K_i$	14.9	5.3	35.8			157.1	40.3	25.7			157.2	47.3	30.1		
		$\gamma$	1.5	0.1	9.7			1.5	0.2	10.1			1.5	0.2	10.7		
	CYP3A1/2	$V_{max}$	758.0	19.7	2.6	698.9	707.2	784.5	16.5	2.1	686.0	694.4	781.7	20.3	2.6	708.7	717.1
$K_m$		21.8	2.1	9.4			26.4	1.6	6.1			27.5	2.0	7.5			
$K_i$		48.8	9.8	20.0			363.5	36.9	10.2			328.0	42.4	12.9			
$\gamma$		1.1	0.1	6.0			1.2	0.1	5.4			1.3	0.1	6.5			

KT: Ketoprofè ( $\mu\text{M}$ ), KTA: Ketamina ( $\mu\text{M}$ ), BN: Buprenorfina ( $\mu\text{M}$ ), FEN: Fentanil ( $\mu\text{M}$ ), XYL: Xilacina ( $\mu\text{M}$ )

$V_{max}$  : velocitat màxima (pmol/mg proteïna/min)

$K_m$  : constant de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )

$K_i$  : constant d'inhibició ( $\mu\text{M}$ )

SD: desviació estàndar

CV(%): coeficient de variació (%)

AIC: criteri estadístic d'Akaike

SBC: criteri estadístic de Schwarz

De cada reacció fàrmac-isoforma es va establir que el model d'inhibició que millor ajustava en cada cas era aquell que tenia els valors de la criteris estadístics d'AIC i de SBC més baixos, tal i com s'indica a la secció 6.3.4.

A continuació, per establir si existia alguna interacció potencial per inhibició en l'activitat d'una isoforma CYP450, es van comparar el valors de la  $K_i$  de cada relació fàrmac-isoforma, amb els valors de les concentracions plasmàtiques en rata

després de l'administració de l'anestèsic/analgèsic (Taula 49), trobades en la bibliografia. En el cas de la XYL, el valor de  $K_i$  es va comparar amb el valor de la concentració en sang del fàrmac, perquè es va assumir una relació 1:1 plasma:sang.

**Taula 49 Concentracions Terapèutiques de Fàrmac en Plasma / Sang de Rata**

Fàrmac	Concentració ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	plasma	sang
KT	100 - 300	
KTA	10	
BN	0.01 - 3	
FEN	0.15	
XYL		18

*KT: Ketoprofè (ref. 18); KTA: Ketamina (ref. 37); BN: Buprenorfina (ref. 41); FEN: Fentanil (ref. 53); XYL: Xilacina (ref. 57)*

La Taula 50 mostra els valors d' $IC_{50}$  i de  $K_i$ , a més del tipus d'inhibició, per les relacions fàrmac-isoforma CYP450 que en el test estadístic havien donat diferències estadísticament significatives entre els valors dels Quocients  $K_m/V_{max}$  per cada fàrmac i isoforma CYP450.

**Taula 50** Valors dels Paràmetres d’Inhibició ( $IC_{50}$  i  $K_i$ ) i Tipus d’Inhibició per 18 Relacions Fàrmac-Isoforma CYP450 Resultants del Test Estadístic

Fàrmac	CYP450	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ )	$K_i$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	$K_i$ ( $\mu g/ml$ ) <sup>a</sup>	Tipus inhibició
<b>KT</b>	CYP2A1/2	38921.1	<b>9897.2</b>	18013.5	<b>4580.7</b>	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2B1/2	3112.6	<b>791.5</b>	3052.0	<b>776.1</b>	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2C	n.c.	-	16414.0	<b>4173.9</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2C11	3117.9	<b>792.9</b>	4481.0	<b>1139.5</b>	acompetitiva <sup>2</sup>
	CYP3A1/2	1058.7	<b>269.2</b>	702.7	<b>178.7</b>	MIXTA
<b>KTA</b>	CYP2B1/2	72.9	<b>19.9</b>	41.8	<b>11.4</b>	COMPETITIVA <sup>1</sup>
	CYP2C	84.3	<b>23.0</b>	627.1	<b>171.4</b>	no competitiva <sup>2</sup>
	CYP2C11	209.5	<b>57.4</b>	72.8	<b>19.9</b>	competitiva <sup>1</sup>
	CYP2D1	693.8	<b>189.6</b>	230.0	<b>62.9</b>	mixta
<b>BN</b>	CYP3A1/2	5.5	<b>2.6</b>	5.1	<b>2.4</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
<b>FEN</b>	CYP1A1/2	49.0	<b>25.9</b>	71.7	<b>37.9</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2B1/2	142.2	<b>75.2</b>	107.1	<b>56.6</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2D1	m.p.	-	48.6	<b>25.7</b>	competitiva <sup>1</sup>
<b>XYL</b>	CYP2A1/2	769.7	<b>169.6</b>	1351.2	<b>297.7</b>	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2C	59.8	<b>13.2</b>	50.9	<b>11.2</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
	CYP2C11	62.9	<b>13.9</b>	14.9	<b>3.3</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
	CYP2D1	75.0	<b>16.5</b>	26.7	<b>5.9</b>	COMPETITIVA <sup>1</sup>
	CYP3A1/2	162.4	<b>35.8</b>	120.7	<b>26.6</b>	MIXTA

KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, BN: Buprenorfina, FEN: Fentanil, XYL: Xilacina.

$K_i^a$ : paràmetre estimat per SNLR amb WinNonlin®

m.p.: no hi ha valor en aquesta concentració

n.c.: no es pot calcular. Ajustat erroni de l’equació utilitzant el SigmaPlot.

<sup>1</sup>: Equacions derivades del model de Michaelis-Menten

<sup>2</sup>: Equacions derivades del model de Hill (Sigmoidal)

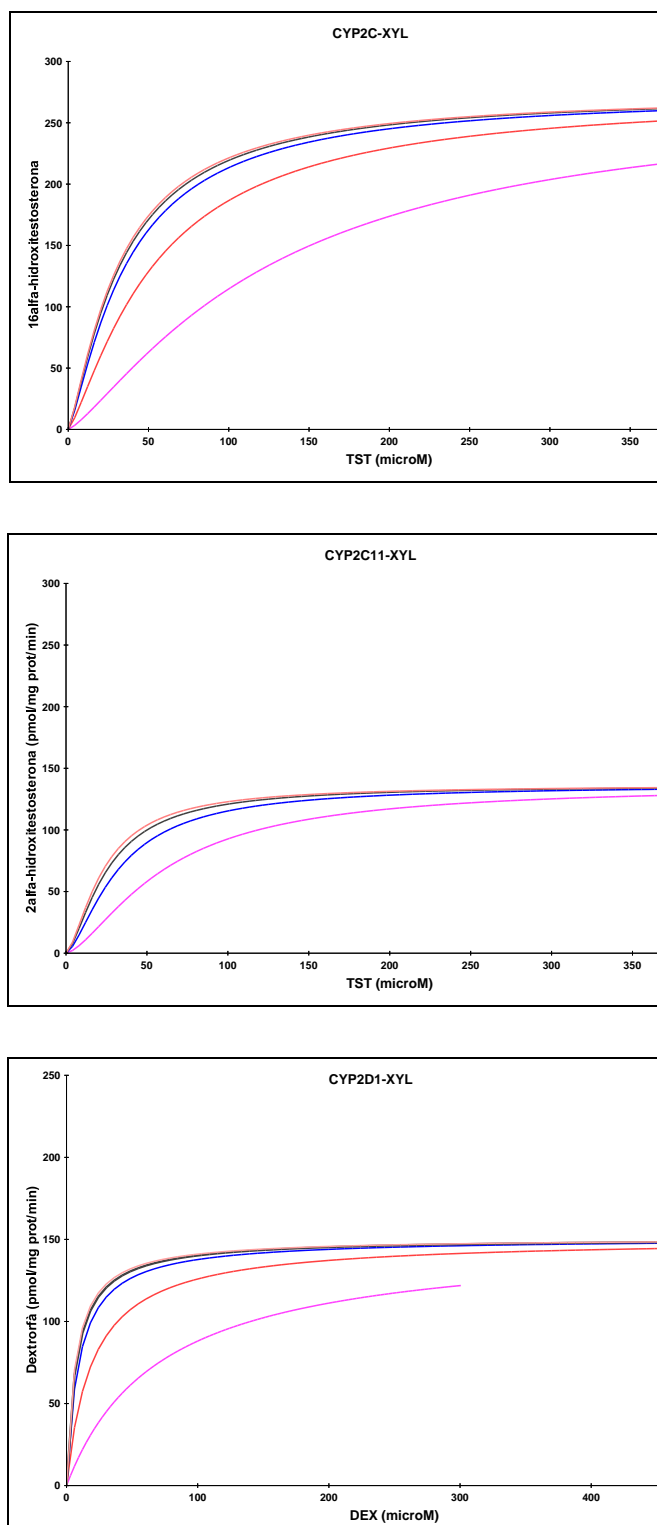
Tipus d’inhibició Majúscula: valor de  $K_i$  ( $\mu M$ ) molt similar o inferior a la concentració de fàrmac trobada en plasma. Interacció potencial per inhibició.

Concentracions en plasma: Ketoprofè, 1179.8  $\mu M$ , Ketamina, 36.6  $\mu M$ , Buprenorfina, 6.4  $\mu M$ , Fentanil, 0.28  $\mu M$ , Xilacina, 81.7  $\mu M$  (concentració en sang).

Els valors de  $K_i$  iguals o inferiors a les concentracions plasmàtiques són els corresponents a les relacions: KT-CYP3A1/2, KTA-CYP2B1/2, BN-CYP3A1/2, i XYL-CYP2C, CYP2C11, CYP2D1 i CYP3A1/2.

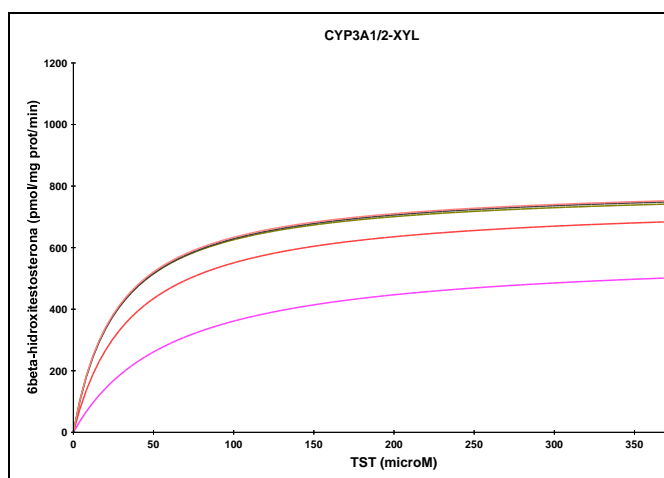
Les següents Figures (Figura 35, Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39) són les representacions gràfiques dels ajustaments per SNLR de les set interaccions potencials per inhibició en l’activitat CYP450 esmentades.

Figura 35 Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. XYL-CYP2C, XYL-CYP2C11, XYL-CYP2D1



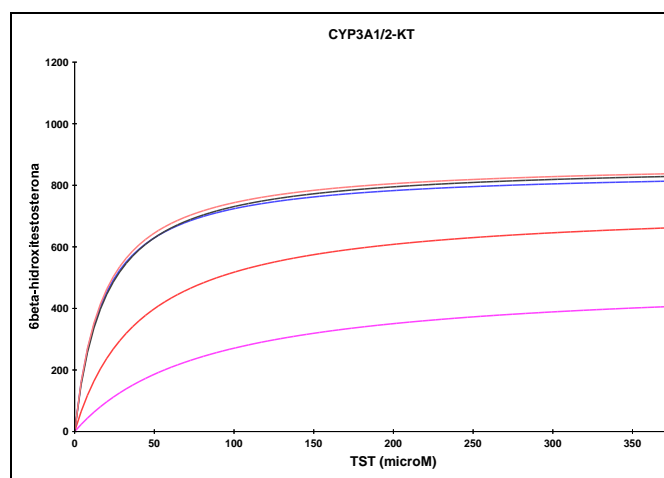
XYL: Xilacina, TST: Testosterona, DEX: Dextrometorfà

Figura 36 Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. XYL-CYP3A1/2



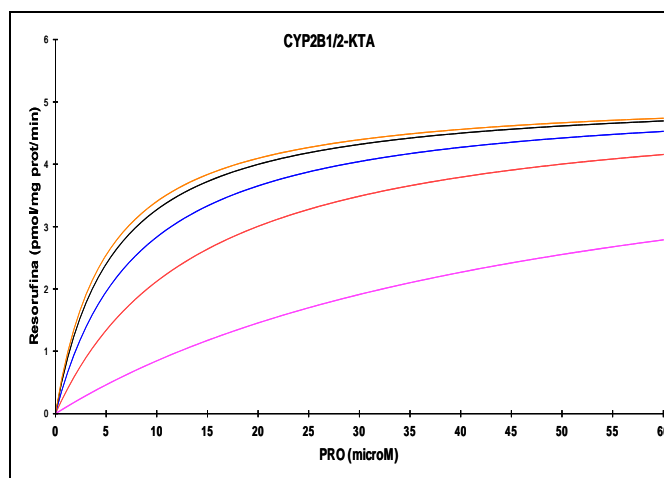
Corbes: taronja, concentració 0 de XYL; negra, concentració 2.5 $\mu$ M de XYL; blava, concentració 10 $\mu$ M de XYL; vermella, concentració 50 $\mu$ M de XYL; rosa, concentració 250 $\mu$ M de XYL.  
XYL: Xilacina, TST: Testosterona

Figura 37 Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. KT-CYP3A1/2



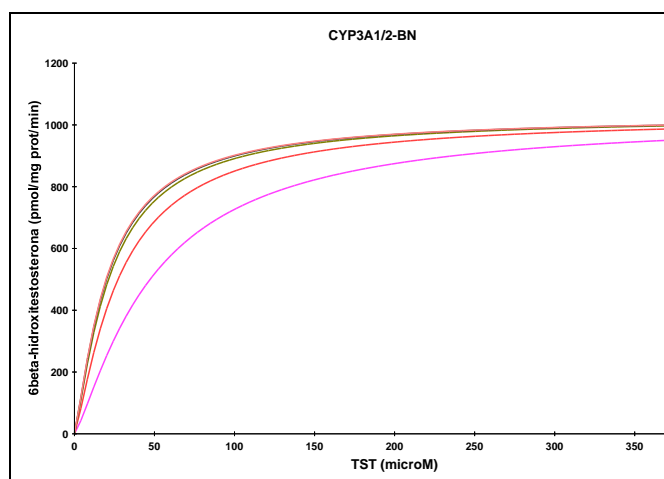
Corbes: taronja, concentració 0 de KT; negra, concentració 50 $\mu$ M de KT; blava, concentració 200 $\mu$ M de KT; vermella, concentració 1250 $\mu$ M de KT; rosa, concentració 5000 $\mu$ M de KT.  
KT: Ketoprofè, TST: Testosterona

Figura 38 Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. KTA-CYP2B1/2



Corbes: taronja, concentració 0 de KTA; negra, concentració 5 μM de KTA; blava, concentració 25 μM de KTA; vermella, concentració 75 μM de KTA; rosa, concentració 375 μM de KTA.  
KTA: Ketamina, PRO: Pentoxiresorufina

Figura 39 Corbes de Regressió No-Lineal Obtingudes per SNLR. BN-CYP3A1/2



Corbes: taronja, concentració 0 de BN; negra, concentració 0.1 μM de BN; blava, concentració 0.5 μM de BN; vermella, concentració 2.5 μM de BN; rosa, concentració 10 μM de BN.  
BN: Buprenorfina TST: Testosterona



## Resultats

### 7.3.4 Càlcul de la $K_i$ . Mètode de la $K_{m,app}$ i Mètode “ $IC_{50}$ -to- $K_i$ Converter”

La Taula 51 mostra els valors de  $K_i$  estimats pel mètode de la  $K_{m,app}$  (secció 6.3.5), i pel mètode de “ $IC_{50}$ -to- $K_i$  Converter” (secció 6.3.6). A més, a la Taula s’inclouen els valors de  $K_i$  obtinguts pels mètode de SNLR (secció 6.3.3) per comparar entre ells.

**Taula 51** Valors de  $K_i$  Estimats pels Mètodes de: SNLR, “ $K_{m,app}$ ” i “ $IC_{50}$ -to- $K_i$  Converter”

Fàrmac	CYP450	$K_i$ ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	$K_i$ ( $\mu$ M) <sup>c</sup>	Tipus d’Inhibició
KT	CYP2A1/2	18013.5	51550.1	38921.1	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2B1/2	3052.0	1643.5	3112.6	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2C	16414.0	17093.0	-	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2C11	4481.0	4742.5	8328,4	acompetitiva <sup>2</sup>
	CYP3A1/2	702.7	350.0	-	MIXTA
KTA	CYP2B1/2	41.8	150.7	46.4	COMPETITIVA <sup>1</sup>
	CYP2C	627.1	164.2	72,8	no competitiva <sup>2</sup>
	CYP2C11	72.8	98.4	66.4	competitiva <sup>1</sup>
	CYP2D1	230.0	202.5	-	mixta
BN	CYP3A1/2	5.1	6.2	3,9	COMPETITIVA <sup>2</sup>
FEN	CYP1A1/2	71.7	n.c.	47.4	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2B1/2	107.1	n.c.	75.4	acompetitiva <sup>1</sup>
	CYP2D1	48.6	10.7	-	competitiva <sup>1</sup>
XYL	CYP2A1/2	1351.2	493.3	769.7	no competitiva <sup>1</sup>
	CYP2C	50.9	100.6	47,6	COMPETITIVA <sup>2</sup>
	CYP2C11	14.9	42.4	4,5	COMPETITIVA <sup>2</sup>
	CYP2D1	26.7	58.6	17.1	COMPETITIVA <sup>1</sup>
	CYP3A1/2	120.7	114.1	-	MIXTA

KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, BN: Buprenorfina, FEN: Fentanil i XYL: Xilacina

$K_i^a$  : paràmetre estimat per SNLR amb WinNonlin®

$K_i^b$  : paràmetre estimat per el "Mètode  $K_{m,app}$ "

$K_i^c$  : paràmetre estimat amb el mètode "IC<sub>50</sub>-to- $K_i$  Converter"

m.p.: no hi ha valor en aquesta concentració de substracte. Error experiment.

- : no es va calcular. El mètode no permet

n.c. : no es pot calcular. Ajustat erroni

<sup>1</sup> : Equacions derivades del model de Michaelis-Menten

<sup>2</sup> : Equacions derivades del model de Hill (Sigmoidal)

Tipus d’inhibició Majúscula: valor de  $K_i$  ( $\mu$ M) molt similar o inferior a la concentració de fàrmac trobada en plasma. Interacció potencial per inhibició.

Concentracions en plasma: Ketoprofè, 1179.8  $\mu$ M, Ketamina, 36.6  $\mu$ M, Buprenorfina, 6.4  $\mu$ M, Fentanil, 0.28  $\mu$ M, Xilacina, 81.7  $\mu$ M (concentració en sang).

Valors que no es poden estimar per aquests mètodes

En els ajustaments KT-CYP2C i FEN-CYP2D1 no es van estimar els valors de la  $K_i$ , amb el model “IC<sub>50</sub>-to- $K_i$ -Converter”, perquè no havia el valor de l'IC<sub>50</sub> necessari pel càlcul. En el primer cas (KT-CYP2C) perquè el model per estimar l'IC<sub>50</sub> ajustava de forma errònia a les dades, i en el segon cas (FEN-CYP2D1) per un error experimental en què es van perdre mostres.

Per KTA-CYP2D1 i XYL-CYP3A1/2 no es va estimar la  $K_i$ , pel mètode de “IC<sub>50</sub>-to- $K_i$  Converter”, perquè el mètode no contempla el càlcul en el cas d'inhibició Mixta.

Per KT-CYP2C11, KTA-CYP2C, BN-CYP3A1/2, XYL-CYP2C i XYL-CYP2C11 es va estimar el valor de la  $K_i$  pel mètode “IC<sub>50</sub>-to- $K_i$  Converter” encara que el model d'inhibició per SNLR que millor ajusta les dades, està deduït de l'equació de Hill, i el mètode “IC<sub>50</sub>-to- $K_i$  Converter” està desenvolupat per cinètiques de M-M. El càlcul es realitzar per comparar els valors de  $K_i$  entre els diferents mètodes. Per aquest mateix motiu, es va calcular el valor de la  $K_i$  pel mètode de la “ $K_{m,app}$ ” en casos que no correspondria.

#### **7.4 Determinació de la Unió No-Específica del KT, la KTA, el BN, el FEN i la XYL a Proteïnes Microsomals**

A continuació es mostren les Taules amb els valors de  $f_{u,mic}$  dels fàrmacs. Aquests valors es van obtenir experimentalment pel Model *in vitro* (només la ketamina), o bé calculats pel Model *in silico* (tots els fàrmacs).

##### **7.4.1 Determinació de la Unió No-específica de la KTA a Proteïnes Microsomals. Model *In vitro***

Les següents taules mostren les dades experimentals i el càlculs realitzats, tal i com s'indica a la secció 6.4.

## Resultats

### 7.4.1.1 Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R)

**Taula 52** Determinació de la  $f_{u,mic}$  pel Model *In vitro*. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de Recuperació (%R)

Concentració (pmol/ml)	Àrea de pic de KTA								R(%)
	FMS				RLMS				Mitjana
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$R_{FMS}$	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$R_{RLMS}$	
1	103059	95860	114909	104609	111579	105548	95334	104154	99.6
5	683090	602506	673005	652867	521645	572437	589156	561079	85.9
10	1379938	900498	1123924	1134787	1069827	1125406	1027801	1074345	94.7
50	5564477	7000122	7135612	6566737	4862541	5639757	5817590	5439963	82.8
100	13056945	8503174	10794494	10784871	10539464	9599170	10024379	10054338	93.2
<b>Mitjana R(%)</b>									<b>91.2</b>

KTA: ketamina

FMS: matriu filtrada

RLMS: RLM

R(%): recuperació (%)

$R_{FMS}$ : mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en FMS

$R_{RLMS}$ : mitjana (n=3) de l'àrea de pic de KTA en RLMS

### 7.4.1.2 Càlcul del Percentatge de KTA No Unida (%M) al Material d'Ultracentrifugació

**Taula 53** Determinació de la  $f_{u,mic}$  pel Model *In vitro*. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de KTA No Unida al Material d'Ultracentrifugació (%M)

Concentració (pmol/ml)	Àrea de pic de KTA								M(%)
	FMS-A				FMS-B				Mitjana
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$M_A$	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$M_B$	
5	s.l.	s.l.	446922	446922	397637	403490	403232	401453	89.8
25	2445536	2459354	2527160	2477350	2211075	2241354	2180677	2211035	89.3
100	9443949	9435530	9614105	9497861	8591189	8727782	8852662	8723878	91.9
<b>Mitjana M(%)</b>									<b>90.3</b>

KTA: ketamina

s.l.: mostra perduda durant l'anàlisi

M(%): percentatge de KTA unit al filtre del sistema

$M_A$ : mitjana (n=3) de l'àrea de pic de la ketamina en FMS-A

$M_B$ : mitjana (n=3) de l'àrea de pic de la ketamina en FMS-B

## 7.4.1.3 Càlcul del Percentatge de KTA Unit (%B) i No Unit (%F)

**Taula 54** Determinació de la  $f_{u,mic}$  pel Model *In vitro*. Dades Experimentals i Càlcul del Percentatge de KTA No Unida als RLM (%F)

Concentració (pmol/ml)	Àrea de pic de KTA								F(%)
	RLMS-A				RLMS-B				Mitjana
	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$C_{RLMS-A}$	replicat 1	replicat 2	replicat 3	$C_{RLMS-B}$	
5	2.3	2.5	2.5	2.4	2.0	2.0	2.1	2.0	82.9
25	21.5	17.3	20	19.6	18.7	15	17.4	17.0	86.8
100	88.1	86.8	84.6	86.5	78.7	77.2	76.4	77.5	89.5
<b>Mitjana F(%)</b>									<b>86.4</b>
<b>Mitjana B(%)</b>									<b>13.6</b>

RLMS-A: mostres de RLM no filtrades

RLMS-B: mostres de RLM filtrades

F(%): percentatge de KTA no unit

B(%): percentatge de KTA unit al filtre del sistema

$C_{RLMS-A}$ : mitjana ( $n=3$ ) de la concentració de ketamina en les mostres RLMS-A

$C_{RLMS-B}$ : mitjana ( $n=3$ ) de la concentració de ketamina en les mostres RLMS-B

KTA: ketamina

El valor de  $f_{u,mic}$  de la KTA estimat pel mètode de determinació de la unió no-específica a proteïnes microsomals *in vitro*, és 0.86.

#### 7.4.2 Unió No-Específica a les Proteïnes Microsomals Utilitzant les Propietats Físico-Químiques del KT, la KTA, la BN, el FEN i la XYL. Model *In silico*

Els valors obtinguts de  $f_{u,mic}$  que es mostren a la Taula 55, es van calcular seguint les equacions de la secció 6.4.2.

**Taula 55** Tipus de Càrrega i Valors de  $f_{u,mic}$  de cada Fàrmac segons el Model de Predicció *In silico* Utilitzat

Fàrmac	Tipus de càrrega	pKa	logD <sub>7.4</sub>	logP	$f_{u,mic}$ predit <i>in silico</i> *					$f_{u,mic}$ <i>in vitro</i>
					Model Austin	Model Hallifax	Model combinat 1	Model combinat 2	Model Simcyp®	
<b>KT</b> <sup>a</sup>	àcida	4.60	-0.09	2.71	0.97		0.97	0.98	<b>0.91</b>	0.86
<b>KTA</b> <sup>b</sup>	bàsica	6.46		2.18		0.87	0.61	0.76	<b>0.85</b>	
<b>FEN</b> <sup>b</sup>	bàsica	9.06		3.89		0.79	0.15	0.25	<b>0.37</b>	
<b>BN</b> <sup>b</sup>	bàsica	8.31		3.44		0.82	0.23	0.38	<b>0.52</b>	
<b>XYL</b> <sup>b</sup>	bàsica	7.67		2.37		0.86	0.55	0.71	<b>0.82</b>	

\*: Es considera ajustada la concentració de proteïna microsomal a 1 mg/ml, excepte al Model combinat 2 (conc. Proteïna=0.5 mg/ml)

<sup>a</sup>: Valors de pKa, logD<sub>7.4</sub> i logP obtinguts de bibliografia. (ref. 100).

## Resultats

<sup>b</sup>: Valors de  $pK_a$  i  $\log P$  calculats usant el software Advanced Chemistry Development (ACD/Labs). (ref. 101).

Model Austin:  $f_{u,mic}$  predit per el model d'Austin. Fòrmula:  $0.53\log P/D-1.42$  (.ref. 100).

Model Hallifax:  $f_{u,mic}$  predit per el model de Hallifax. (ref. 98).

Model combinat:  $f_{u,mic}$  calculat amb la fòrmula:  $f_{u,mic}=1/(C*10^{0.56\log P/D-1.41+1}).C$ , és la concentració de proteïna microsomal. (ref. 100).

Model combinat 1,  $C=1$ ; Model combinat 2,  $C=0.5$ .

Model Simcyp®:  $f_{u,mic}$  calculat utilitzant el model de Turner et al. Manuscript preparation. Simcyp Limited, University of Shefflied, UK

$f_{u,mic}$  *in vitro*:  $f_{u,mic}$  obtingut experimentalment. 1 mg/ml concentració proteïna microsomal.

KT: ketoprofè, KTA: ketamina; FEN: fentanil; BN: buprenorfina; XYL: xilacina.

(ref. 104, ref. 105, ref. 106, ref. 107, ref. 108, ref. 109, ref. 110)

### 7.5 Càlcul de la $K_i$ Modificada per $f_{u,mic}$

A la Taula 56 es mostren els valors de  $f_{u,mic}$  i els valors de  $K_i$  no unida per les 18 relacions fàrmac-isoforma CYP450 susceptibles d'interaccionar indicades en la secció 7.3.3: KT-(CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2); KTA-(CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP2D1); BN-CYP3A1/2; FEN-(CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2D1); i XYL-(CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11, CYP2D1 i CYP3A1/2).

El valor de la  $K_i$  no unida es va estimar tenint en compte el factor  $f_{u,mic}$  obtingut pel model *in vitro* (en el cas de la KTA), i pels models *in silico* (Simcyp®, Austin i Hallifax) per la resta de fàrmacs.

**Taula 56** Valors de  $f_{u,mic}$  Determinada *In silico* per KT, BN, FEN I XYL i *In vitro* per la KTA. Càlcul de la  $K_i$  No Unida

Fàrmac	CYP450	$f_{u,mic}$	$K_i^u$ ( $\mu$ M)	$K_i^u$ ( $\mu$ g/ml)	Tipus inhibició
KT	CYP2A1/2	0.91 <sup>a</sup>	16392.3	<b>4168.4</b>	no competitiva <sup>1</sup>
		0.97 <sup>b</sup>	17473.1	<b>4443.2</b>	
	CYP2B1/2	0.91 <sup>a</sup>	2777.3	<b>706.2</b>	no competitiva <sup>1</sup>
		0.97 <sup>b</sup>	2960.4	<b>752.8</b>	
	CYP2C	0.91 <sup>a</sup>	14936.7	<b>3798.3</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
CYP2C11	0.91 <sup>a</sup>	4077.7	<b>1036.9</b>	acompetitiva <sup>2</sup>	
	0.97 <sup>b</sup>	4346.6	<b>1105.3</b>		
CYP3A1/2	0.91 <sup>a</sup>	639.5	<b>162.6</b>	MIXTA	
	0.97 <sup>b</sup>	681.6	<b>173.3</b>		
KTA	CYP2B1/2	0.86 <sup>c</sup>	35.9	<b>9.8</b>	COMPETITIVA <sup>1</sup>
	CYP2C		539.3	<b>147.4</b>	no competitiva <sup>2</sup>
	CYP2C11		62.6	<b>17.1</b>	competitiva <sup>1</sup>
	CYP2D1		197.8	<b>54.1</b>	mixta
BN	CYP3A1/2	0.52 <sup>a</sup>	2.6	<b>1.2</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
		0.82 <sup>d</sup>	4.2	<b>1.9</b>	
FEN	CYP1A1/2	0.37 <sup>a</sup>	26.5	<b>14.0</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
		0.79 <sup>d</sup>	56.6	<b>29.9</b>	
	CYP2B1/2	0.37 <sup>a</sup>	39.6	<b>20.9</b>	acompetitiva <sup>1</sup>
		0.79 <sup>d</sup>	84.6	<b>44.7</b>	
	CYP2D1	0.37 <sup>a</sup>	18.0	<b>9.5</b>	competitiva <sup>1</sup>
		0.79 <sup>d</sup>	38.394	<b>20</b>	
XYL	CYP2A1/2	0.82 <sup>a</sup>	1108.0	<b>244.1</b>	no competitiva <sup>1</sup>
		0.86 <sup>d</sup>	1162.0	<b>256.0</b>	
	CYP2C	0.82 <sup>a</sup>	41.7	<b>9.2</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
		0.86 <sup>d</sup>	43.8	<b>9.6</b>	
	CYP2C11	0.82 <sup>a</sup>	12.2	<b>2.7</b>	COMPETITIVA <sup>2</sup>
		0.86 <sup>d</sup>	12.8	<b>2.8</b>	
	CYP2D1	0.82 <sup>a</sup>	21.9	<b>4.8</b>	COMPETITIVA <sup>1</sup>
		0.86 <sup>d</sup>	23.0	<b>5.1</b>	
	CYP3A1/2	0.82 <sup>a</sup>	98.9	<b>21.8</b>	MIXTA
		0.86 <sup>d</sup>	103.8	<b>22.9</b>	

KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, BN: Buprenorfina, FEN: Fentanil, XYL: Xilacina  
 $f_{u,mic}$ : fracció de fàrmac lliure

$K_i$ : constant d'inhibició estimada per SNLR amb WinNonlin®

u: valor de  $K_i$  no unida

a: model de càlcul *in silico* Symcyp®

b: model de càlcul *in silico* d'Austin

c: model de determinació *in vitro*

d: model de càlcul *in silico* de Halifax

<sup>1</sup>: Equacions derivades del model de M-M

<sup>2</sup>: Equacions derivades del model de Hill (Sigmoidal)

Tipus d'inhibició Majúscula: valor de  $K_i$  ( $\mu$ M) molt similar o inferior a la concentració de fàrmac trobada en plasma. Interacció potencial per inhibició.

Concentracions en plasma: Ketoprofè, 1179.8  $\mu$ M, Ketamina, 36.6  $\mu$ M, Buprenorfina, 6.4  $\mu$ M, Fentanil, 0.28  $\mu$ M, Xilacina, 81.7  $\mu$ M (concentració en sang).

## 7.6 Predicció d'Interaccions Potencials *In Vivo*. Càlcul de $R_{exp}$

En la següent Taula 57 es mostren els valors del quocient  $R_{exp}$  en les 18 interaccions potencials per inhibició. Pel càlcul de la  $K_i$  no unida es va emprar el valor de  $f_{u,mic}$  més baix en cada cas.

Taula 57 Valors del Quocient  $R_{exp}$  per cada Fàrmac i Isoforma

Fàrmac	CYP450	$f_{u,mic}$	$K_i^u$ ( $\mu M$ )	Concentració Plasmàtica*		$R_{exp}$
				$\mu g/ml$	$\mu M$	
KT	CYP2A1/2	0.91 <sup>a</sup>	16392,3	300	1179,8	1,1
	CYP2B1/2		2777,3			1,4
	CYP2C		14936,7			1,1
	CYP2C11		4077,7			1,3
	CYP3A1/2		639,5			2,8
KTA	CYP2B1/2	0.86 <sup>invitro</sup>	35,9	10	36,6	2,0
	CYP2C		539,3			1,1
	CYP2C11		62,6			1,6
	CYP2D1		197,8			1,2
BN	CYP3A1/2	0,52 <sup>a</sup>	2,6	3	6,4	3,4
FEN	CYP1A1/2	0,37 <sup>a</sup>	26,5	0,15	0,28	1,0
	CYP2B1/2		39,6			1,0
	CYP2D1		18,0			1,0
XYL	CYP2A1/2	0,82 <sup>a</sup>	1108,0	18	81,7	1,1
	CYP2C		41,7			3,0
	CYP2C11		12,2			7,7
	CYP2D1		21,9			4,7
	CYP3A1/2		98,9			1,8

KT: Ketoprofè, KTA: Ketamina, BN: Buprenorfina, FEN: Fentanil, XYL: Xilacina

$f_{u,mic}$ : fracció de fàrmac lliure

$K_i$ : constant d'inhibició estimada per SNLR amb WinNonlin®

$u$ : valor de  $K_i$  no unida

<sup>a</sup>: model de càlcul *in silico* Simcyp®

<sup>invitro</sup>: model de determinació *in vitro*

En aquesta taula i pel càlcul de la  $R_{exp}$  s'utilitza el valor de  $f_{u,mic}$  més baix

Concentracions en plasma: Ketoprofè, 1179.8  $\mu M$ , Ketamina, 36.6  $\mu M$ , Buprenorfina, 6.4  $\mu M$ , Fentanil, 0.28  $\mu M$ , Xilacina, 81.7  $\mu M$  (concentració en sang).

\*: concentració sanguínia en el cas de la Xilacina

## 8 DISCUSIÓ

Quan s'elabora un protocol experimental, per l'estudi del metabolisme i la disposició d'un nou fàrmac, un dubte que sovint es planteja, és quin tipus d'anestèsic/analgèsic es pot emprar en la rata de laboratori per no interferir en el metabolisme del fàrmac, i no afectar les dades obtingudes.

En el present treball es van seleccionar una sèrie d'anestèsics i d'analgèsics en funció de la seva freqüència d'ús. El Ketoprofè, la Ketamina, el Fentanil, la Buprenorfina i la Xilacina són els més utilitzats en la rata. Encara que està descrit que són substracte del complex CYP450 en major o menor proporció, no existeixen gaires dades sobre les seves interaccions amb aquest complex. El KT s'hidroxila per acció del CYP450 encara que en una proporció molt petita (ref. 19, ref. 20); un 26% de la KTA és biotransforma en el metabòlit norketamina (N-desmetilació de la KTA) (ref. 27); també una part de la desalquilació de la BN té lloc en el fetge produint norbuprenorfina (ref. 39, ref. 41); el FEN es metabolitza principalment donant norfentanil (ref. 52); i un 35% de la XYL administrada es transforma en el seu metabòlit principal (N-(2,6-dimetilfenil)tiourea) (ref. 59).

El CYP450 és un complex enzimàtic que catalitza principalment reaccions d'oxidació en organismes, i la seva funció catalítica està relacionada amb el metabolisme de la majoria dels fàrmacs i xenobiòtics. El CYP450 és una superfamília d'isoformes P450, de les quals les principals encarregades del metabolisme de xenobiòtics en rata són les que s'estudien: les CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1 i CYP3A1/2.

Per aquest motiu, en el present treball s'estudien les interaccions potencials dels anestesics KTA i XYL i els analgèsics KT, BN i FEN amb les principals isoformes de CYP450 hepàtiques de rata Sprague Dawley mascle.

En el present treball s'han dissenyat experiments d'inhibició de la forma més simplificada possible, reduint el número de concentracions de substracte específic (4), i d'analgèsic/anestèsic (5), així com el número de replicats (3). Però a la vegada, aquests experiments són suficients com per aportar l'informació necessària de forma



fiable. Els experiments es van dissenyar amb la recopilació de dades bibliogràfiques d'articles científics publicats (ref. 86, ref. 87, ref. 88, ref. 89, ref. 90, ref. 91).

El desenvolupament d'aquest estudi comença per l'obtenció i caracterització del sistema experimental. El sistema experimental són els microsomes de fetge de rata. Per obtenir-los, les rates es sacrifiquen i s'intervenien seguint els procediments ètics aprovats per un Comitè d'Experimentació Animal. Els microsomes s'obtenen per dos mètodes descrits en la bibliografia, el mètode de precipitació amb Calci (que és el primer mètode descrit per obtenir microsomes, i que presenta l'avantatge de que no precisa d'una ultracentrifuga), i el mètode d'ultracentrifugació, que és el mètode més utilitzat en l'actualitat, i que per tant permet la comparació de resultats entre laboratoris o grups de treball. L'obtenció i posterior caracterització dels microsomes pels dos processos mostra que el mètode d'ultracentrifugació a més de ser el més senzill i fàcil de realitzar, sol tenir un rendiment més elevat, i es pot aconseguir una concentració de proteïna microsomal més alta.

A continuació, es posen a punt tres mètodes per caracteritzar cada lot de microsomes:

- Per mesurar la concentració de proteïna microsomal.
- Per mesurar la concentració de CYP450.
- Per determinar l'activitat NADPH-CYP450 reductasa.

La concentració de la proteïna microsomal es mesura amb el mètode comercialitzat de "Micro Lowry, Onishi & Barr modification", segons es descriu a la secció 5.2.1. Els valors de les concentracions de proteïna microsomal obtinguts pels dos mètodes (precipitació amb Calci i ultracentrifugació), són suficientment alts com per poder ajustar la concentració de la proteïna a les concentracions especificades en els certificats de qualitat dels microsomes comercialitzats, que són les concentracions de treball habitual (20, 10 i 5 mg/ml).

El mètode per la mesura de la concentració de CYP450 es posa a punt en el present treball, tal i com es detalla a la secció 5.2.2. La mesura consisteix en la reducció del ferro del centre catalític del CYP450 i la posterior incorporació d'una molècula de

CO al mateix, i tot seguit, es mesura l'absorció per espectrometria. El complex ferro reduït-CO dona un espectre d'absorció màxim a 450 nm.

El mètode per la determinació de l'activitat NADPH-CYP450 reductasa també es posa a punt en el present treball, segons es descriu a la secció 5.2.3. El procediment consisteix en una mesura indirecta de l'activitat NADPH-CYP450 reductasa mitjançant un sistema que quantifica el Citocrom C reduït. El Citocrom C és una proteïna transportadora d'electrons que accepta els electrons provinents de la NADPH-reductasa, es redueix i presenta un màxim d'absorció a 550 nm.

Els continguts de CYP450 (0.4 i 0.7 nmol CYP450/mg proteïna) i els valors d'activitat de la NADPH-CYP450 reductasa (171.5-265.9 nmol/mg proteïna/min) són similars als especificats en els certificats de qualitat dels lots de microsomes comercialitzats, i amb les dades trobades en la bibliografia (ref. 83, ref. 84, ref. 85).

Una vegada caracteritzats els microsomes, la concentració de la proteïna microsomal s'ajusta a una concentració útil per treballar com s'ha comentat en el paràgraf anterior.

Un aspecte important del present treball és la preparació dels incubats on tenen lloc les reaccions enzimàtiques dels CYP450, i que estan formats pels microsomes (que contenen el CYP450), el sistema generador de NADPH (que permet el funcionament del CYP450), i el substrate específic. La composició dels incubats es detalla a la secció 5.3. Quan finalitza el temps d'incubació, s'atura la reacció en l'incubat, es procedeix a la preparació de la mostra per l'anàlisi, i per últim s'analitza. En aquest treball l'anàlisi de les mostres es fa per HPLC amb detecció UV o fluorescència com es descriu a la secció 5.7. S'utilitzen mètodes que es van desenvolupar recollint informació de la bibliografia i fent proves de posta a punt. Els mètodes es basen en la quantificació del metabòlit format en cada reacció específica (6-hidroxiclorzoxazona, dextrorfà, etoxiresotufina, pentoxiresorufina, 2- $\alpha$ -hidroxitestosterona, 7- $\alpha$ -hidroxitestosterona, 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona i 6- $\beta$ -hidroxitestosterona), per després calcular l'activitat enzimàtica tenint en compte la concentració de proteïna i el temps d'incubació. L'activitat enzimàtica indica la taxa

de formació del metabòlit específic, i les reaccions específiques que s'avaluen són les: clorzoxazona-6-hidroxilasa (CYP2E1), dextrometorfà-O-demetilasa (CYP2D1), etoxiresorufina-O-deetilasa (CYP1A1/2), pentoxiresorufina-O-dealquilasa (CYP2B1/2), i testosterona hidroxilases (que inclou: testosterona-7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP2A1/2), testosterona-16 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP2C), testosterona-2 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP2C11) i testosterona-6 $\beta$ -hidroxilasa (CYP3A1/2)). Veure la Figura 11, secció 5.4.2.

Després que els mètodes analítics s'hagin establert, es posen a punt els mètodes experimentals abans de dissenyar els experiments d'inhibició.

En primer lloc, s'estudia de forma individual per cada reacció específica la linealitat en la formació de metabòlit a partir de cada substrate específic, en funció de la concentració de la proteïna microsomal i en funció del temps d'incubació. Per aquest experiment, tal i com es descriu a la secció 5.4.1, es preparen de forma individual una sèrie d'incubats en què es fixa el temps d'incubació, però les concentracions de la proteïna microsomal varien; i una altra sèrie d'incubats en què es fixa la concentració de la proteïna microsomal però els temps d'incubació són diferents. Aleshores, les dues sèries d'experiments es porten a terme per a cada reacció específica, a la concentració de substrate específic igual o similar a la  $K_m$  de la reacció en qüestió (valor obtingut de bibliografia, ref. 86, ref. 88, ref. 91). Les mostres obtingudes d'aquests experiments es preparen per l'anàlisi, i s'analitzen per HPLC amb el mètode analític corresponent a la reacció específica. Les dades de producció de metabòlit obtingudes de l'anàlisi de les mostres es representen *versus* la concentració de la proteïna microsomal i *versus* el temps d'incubació, i després s'ajusta una regressió lineal (veure la secció 7.2.1). A partir dels resultats obtinguts, el temps d'incubació es fixa a 10 min per totes les reaccions específiques, excepte per la del CYP2D1, que és de 20 min. Per escollir aquests temps, es va considerar que el temps d'incubació fos curt però, que a la vegada la producció de metabòlit en aquest temps fos detectable/quantificable amb la nostra tècnica analítica. Així mateix, la concentració de proteïna microsomal es fixa a 1 mg/ml per les reaccions específiques dels CYP2E1 i CYP2D1, i a 0.5 mg/ml per les reaccions específiques

dels CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2. Veure Taula 3 secció 5.4.1 i Taula 4 secció 5.4.2.

En segon lloc, s'estudia la cinètica enzimàtica de cada CYP450 amb el seu substrate específic, atès que aquests experiments permeten estimar els paràmetres enzimàtics  $K_m$  i  $V_{max}$  de cada reacció específica. És per això que es preparen de forma individual, tal i com s'indica a la secció 5.4.2, una sèrie d'incubats de microsomes a diferents concentracions de substrate específic. Quant a la concentració de proteïna microsomal i el temps d'incubació en aquests incubats estan fixats segons es descriu en el paràgraf anterior. Les concentracions de substrate específic en cada reacció es van seleccionar segons dades bibliogràfiques trobades (concentracions per sota i per sobre del valor de la  $K_m$ ). Aquesta sèrie d'experiments s'efectua per cada reacció específica. Les dades d'activitat enzimàtica es representen *versus* les concentracions de substrate específic, i s'ajusten les equacions de M-M i de Hill.

Els resultats mostren que les cinètiques dels CYP2E1, CYP2D1, CYP2B1/2 i CYP3A1/2 es descriuen millor per l'equació de M-M, en canvi, la cinètica dels CYP1A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2 es descriu millor per l'equació de Hill. La Taula 14 i la Taula 15 de la 7.2.2, mostren com els valors dels criteris estadístics AIC i SBC, així com els valors dels CV% dels paràmetres estimats pels ajustaments cinètics dels CYP1A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2, són més baixos quan s'empra el model de Hill per ajustar les dades. Tot i això, en els CYP1A1/2, CYP2C, CYP2C11 i CYP3A1/2 es van ajustar els dos models (M-M i Hill) a les dades per confirmar el tipus de cinètica enzimàtica, ja que, com s'indica a la bibliografia, l'equació de M-M descriu gairebé totes les cinètiques.

Els valors de  $K_m$  estimats són: CYP2E1, 223.2  $\mu\text{M}$ ; CYP2D1, 6.6  $\mu\text{M}$ ; CYP1A1/2, 1.0  $\mu\text{M}$ ; CYP2B1/2, 3.3  $\mu\text{M}$ ; CYP2A1/2, 10.9  $\mu\text{M}$ ; CYP2C, 44.7  $\mu\text{M}$ ; CYP2C11, 38.3  $\mu\text{M}$ ; i CYP3A1/2, 30.9  $\mu\text{M}$ . Aquests valors són habituals segons la informació trobada en la bibliografia dels valors de  $K_m$  per aquestes isoformes (ref. 86, ref. 88, ref. 91).

Un cop establerts els mètodes experimentals, es procedeix a dissenyar l'estudi d'inhibició. Els experiments dels estudis d'inhibició permeten conèixer si el KT, la KTA, la BN, el FEN i la XYL són inhibidors potencials d'alguna de les isoformes CYP450. Per això, es van preparar de forma individual (veure secció 5.5), incubats de microsomes a cinc concentracions de fàrmac anestèsic/analgesic, per quatre concentracions de substrate específic. La concentració de la proteïna i el temps d'incubació són els especificats als experiments de cinètica enzimàtica. Les concentracions de substrate específic es van seleccionar en funció del valor de la  $K_m$  de cada reacció específica, obtingut de forma experimental en l'anterior estudi de cinètica enzimàtica. En cada cas, s'escolleixen valors per sota i per sobre del valor de la  $K_m$ . Les concentracions de fàrmac es seleccionen en funció de la seva concentració plasmàtica màxima trobada en bibliografia (també es seleccionen valors per sota i per sobre): 25, 50, 1250 i 5000  $\mu\text{M}$  pel KT; 5, 25, 75 i 375  $\mu\text{M}$  per la KTA; 0.02, 0.1, 0.5 i 2.5  $\mu\text{M}$  per la BN; 0.1, 0.5, 5 i 20  $\mu\text{M}$  pel FEN; i 2.5, 10, 50 i 250  $\mu\text{M}$  per la XYL.

A continuació, amb les dades d'activitat enzimàtica resultants dels experiments, s'efectuen diferents càlculs per obtenir els valors de  $K_m$  i  $V_{\max}$ , i els paràmetres d'inhibició,  $K_i$  i  $\text{IC}_{50}$ . Per cada concentració de fàrmac i per cada isoforma es determinen els valors de la  $K_m$  i els valors de la  $V_{\max}$ , com es detalla a la secció 6.2.2. A continuació, es calculen els quocients  $K_m/V_{\max}$  (5 quocients, per un CYP450 i una concentració de fàrmac), i s'aplica un test estadístic que permeten fer una primera selecció dels fàrmacs potencials inhibidors d'una isoforma CYP450. Quan no hi ha inhibició, els valors de la  $K_m$  i de la  $V_{\max}$  no varien significativament amb la concentració de fàrmac, perquè aquest no interfereix en l'activitat d'una isoforma CYP450, i llavors els valors dels quocients són constants. Els tests estadístics aplicats indiquen si hi ha diferències estadísticament significatives entre els valors dels quocients en conjunt per totes les concentracions de fàrmac (inclosa la concentració zero). Aquesta primera selecció, permet que no s'hagin de realitzar els ajustaments dels models d'inhibició (que es descriuen més endavant), en les

situacions en què no hi ha diferències estadísticament significatives entre els quocients, per un CYP450 i una concentració de fàrmac.

En els resultats dels tests estadístics evidencien diferències estadísticament significatives entre els quocients en les següents reaccions específiques: CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP3A1/2, CYP2C11 i CYP2C quan s'incuben els microsomes amb KT; CYP2B1/2, CYP2D1, CYP2C11 i CYP2C amb KTA; CYP3A1/2 amb BN; CYP1A1/2, CYP2B1/2 i CYP2D1 amb FEN; i CYP2D1, CYP3A1/2, CYP2C11, CYP2C i CYP2A1/2 amb XYL.

A partir d'aquí, es calcula el valor de l'IC<sub>50</sub> per les 18 relacions fàrmac-isoforma CYP450 que en el test estadístic havien donat diferències estadísticament significatives. Dels experiments de l'estudi d'inhibició es seleccionen les dades d'activitat enzimàtica d'una sèrie d'incubats individuals de microsomes amb les cinc concentracions de fàrmac (inclosa la concentració zero) i a una de les quatre concentracions de substrate específic, tal i com es descriu a la secció 6.3.2. La concentració de substrate específic seleccionada és la concentració més propera al valor de la K<sub>m</sub> de cada reacció específica (5 µM per ERO i PRO, 25 µM per DEX, i 10 µM per TST). El resum dels valors d'IC<sub>50</sub> obtinguts es mostra a la Taula 58.

**Taula 58 Valors d'IC<sub>50</sub> per cada Fàrmac i Isoforma CYP450 on es Detecta una Interacció Potencial per Inhibició en l'Activitat de la Isoforma**

	Ketoprofè	Ketamina	Buprenorfina	Fentanil	Xilacina
	valors IC <sub>50</sub> (µM)				
CYP1A1/2				49.0	
CYP2B1/2	3112.6	72.9		142.2	
CYP2D1		693.8		<i>m.p.</i>	75.0
CYP3A1/2	1058.7		5.5		162.4
CYP2C11	3117.9	209.5			62.9
CYP2C	<i>no c.</i>	84.3			59.8
CYP2A1/2	38921.1				769.7

IC<sub>50</sub>: concentració d'inhibidor que disminueix l'activitat màxima d'un enzim a la meitat.

*m.p.*: mostres perdudes. No hi ha valor en aquesta concentració de substrate. Error en l'experiment.

*no c.*: no es pot calcular. Ajustat erroni de l'equació utilitzant el SigmaPlot.

combinacions que no presenten interaccions.

Tenint en compte els valors d'IC<sub>50</sub> i comparant-los amb les concentracions màximes esperades de cada fàrmac en plasma, s'observa que hi ha valors de concentracions en plasma superiors als valors d'IC<sub>50</sub>. Això indicaria la possibilitat d'una interacció per inhibició entre el fàrmac i la isoforma corresponent. Aquestes possibles interaccions serien el KT (concentració plasmàtica de 1179.8 µM) que podria interaccionar per inhibició al CYP3A1/2 (IC<sub>50</sub>= 1058.7 µM), la BN (concentració plasmàtica de 6.4 µM) podria interaccionar per inhibició també al CYP3A1/2 (IC<sub>50</sub>= 5.5 µM), i la XYL (concentració plasmàtica de 81.7 µM) podria interaccionar per inhibició als CYP2D1, CYP2C i CYP2C11 (IC<sub>50</sub>= 75.0 µM, 59.8 µM i 62.9 µM, respectivament).

En el present treball s'utilitzen tres mètodes no tradicionals (com serien les representacions de Lineweaver-Burck i de Dixon) per determinar la K<sub>i</sub>. El primer mètode aplicat en el present treball consisteix en el desenvolupament d'una sèrie de models d'inhibició deduïts de l'equació de M-M, i una altra sèrie de models d'inhibició deduïts de l'equació de Hill. L'aplicació d'aquests models d'inhibició reversible mitjançant regressions no-lineals simultànies (SNLR), és un dels aspectes més rellevants del treball, ja que, no estava descrita en publicacions prèvies. Aquests models es programen i es validen en el software WinNonlin, amb les equacions d'inhibició reversible: Competitiva, No Competitiva i Acompetitiva. El segon mètode de "K<sub>m,app</sub>" estima el valor de K<sub>i</sub> a partir de la representació de les concentracions de fàrmac *versus* els valors dels quocients K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub>, i el tercer, que és el mètode de "IC<sub>50</sub>-to-K<sub>i</sub> Converter" que és una eina que existeix a internet i que permet estimar els valors de K<sub>i</sub> a partir dels valors experimentals d'IC<sub>50</sub>. Aquests tres mètodes per determinar la K<sub>i</sub> presenten l'avantage que només necessiten un número reduït de dades d'activitat enzimàtica a diferents concentracions de substrate específic i fàrmac, i que són d'aplicació ràpida.

En aquest primer mètode per determinar la K<sub>i</sub>, i en funció dels criteris estadístics d'AIC i SBC, a més dels valors dels CV% dels paràmetres estimats, tal i com s'indica a la secció 6.3, s'observa que el model Competitiu és el que millor ajusta en

set cinètiques (4 derivades de l'equació de M-M i 3 derivades de l'equació de Hill); els models No Competitiu i Acompetitiu ajusten 4 cinètiques (3 derivades de l'equació de M-M i 1 de l'equació de Hill); i el model Mixte en 3 cinètiques. A l'hora de treballar, com totes les inhibicions estudiades són reversibles, la determinació del tipus d'inhibició és útil per estimar millor el valor de la  $K_i$ .

En el present treball no es comprova si algun d'aquests tipus d'inhibició podia ser irreversible.

Amb els valors de  $K_i$  obtinguts i tenint en compte els valors de concentració màxima en plasma del KT (300 µg/ml, 1179.8 µM), de la KTA (10 µg/ml, 36.6 µM), de la BN (3 µg/ml, 6.4 µM), i del FEN (0.15 µg/ml, 0.28 µM), i la concentració màxima en sang de la XYL (18 µg/ml, 81.7 µM), trobades en la bibliografia (veure la Taula 49 de la secció 7.3.3), s'observen set potencials interaccions per inhibició potencials. Aquestes interaccions són les del KT amb el CYP3A1/2 ( $K_i=702.7$  µM, inhibició Mixta), la KTA amb el CYP2B1/2 ( $K_i= 41.8$  µM inhibició Competitiva deduïda de l'equació de M-M), la BN amb el CYP3A1/2 ( $K_i= 5.1$  µM, inhibició Competitiva deduïda de l'equació de Hill), i la XYL amb els CYP2C ( $K_i=50.9$  µM, inhibició Competitiva deduïda de l'equació de Hill), CYP2C11 ( $K_i=14.9$  µM, inhibició Competitiva deduïda de l'equació de Hill), CYP2D1 ( $K_i=26.7$  µM, inhibició Competitiva deduïda de l'equació de M-M), i el CYP3A1/2 ( $K_i=120.7$  µM, inhibició Mixta). El cas de l'interacció de la XYL amb el CYP3A1/2 i de la KTA amb el CYP2B1/2, s'inclouen com a inhibició potencial a considerar perquè, el valor de la  $K_i$  només és lleugerament superior al valor de concentració màxima referenciada.

Els valors de  $K_i$  estimats pel mètode de la " $K_{m,app}$ " no són similars als obtinguts pel mètode de SNLR. Els valors de  $K_i$  calculats per mètode " $IC_{50}$ -to- $K_i$  Converter" són similars en els següents casos: KT-CYP2B1/2 (3052.0 µM i 3112.6µM, model SNLR i model " $IC_{50}$ -to- $K_i$  Converter", respectivament); KTA-CYP2B1/2 (41.8 µM i 46.4 µM, model SNLR i mètode " $IC_{50}$ -to- $K_i$  Converter", respectivament); KTA-



CYP2C11 (72.8  $\mu\text{M}$  i 66.4  $\mu\text{M}$ , model SNLR i mètode “IC<sub>50</sub>-to-K<sub>i</sub> Converter”, respectivament.

En la comparació entre els valors de K<sub>i</sub> determinats pels tres mètodes, s'ha de tenir en compte que el mètode de la “K<sub>m,app</sub>” està descrit per l'inhibició competitiva deduïda de la cinètica de M-M, i el mètode “IC<sub>50</sub>-to-K<sub>i</sub> Converter” està descrit per utilitzar en les inhibicions Competitiva, No Competitiva i Acompetitiva deduïdes també de la cinètica de M-M. Pels models d'inhibició Mixta i pels derivats de l'equació de Hill no serien aplicables aquests dos mètodes d'estimació de la K<sub>i</sub>.

En una etapa posterior i per precisar al màxim el valor de la K<sub>i</sub>, es determina la fracció de fàrmac no unida a proteïnes microsomals. S'apliquen dos tècniques per estimar el fàrmac no unit/fàrmac unit a proteïnes microsomals.

La primera tècnica que es posa a punt amb les nostres condicions de treball, és la determinació *in vitro* per ultracentrifugació a través d'una membrana per l'ultrafiltració YM-10.000, d'una sèrie d'incubats de microsomes amb KTA. Si bé la tècnica *in vitro* es realitza només amb KTA, el procediment experimental és aplicable a la resta de fàrmacs, si s'adapten les concentracions de l'assaig.

La segona tècnica es la determinació *in silico* de la unió no-específica dels fàrmacs a proteïnes microsomals, que s'inclou en l'estudi perquè és una tècnica que permet conèixer la quantitat de fàrmac no unit de forma senzilla mitjançant l'aplicació d'una sèrie d'equacions (veure secció 6.4.2), i tenint en compte només la càrrega de la molècula de fàrmac. Per la qual cosa, s'estalvia tota la part experimental. Els models que s'utilitzen són: el model de Hallifax (per molècules bàsiques), el model d'Austin (per molècules àcides), el model combinat (pels dos tipus de molècules), i els models de Simcyp® per àcides i bàsiques.

El valor de la fracció no unida ( $f_{u,mic}$ ) de la KTA determinat pel mètode *in vitro* (0.86), és pràcticament igual al calculat *in silico* amb els models de Hallifax (0.87) i de SimCYP® (0.85). En canvi, el model combinat *in silico* calcula un valor més

distant de l'obtingut pel mètode *in vitro*, (0.61). Veure Taula 55, secció 7.4.2. En conseqüència, aquests resultats consoliden l'aplicació de la tècnica *in silico*.

En el present treball també es planteja el càlcul del quocient  $R_{exp}$ , que representa la relació entre l'àrea sota la corba plasmàtica en presència i en absència d'inhibidor (ref. 115), i que s'ha desenvolupat fins arribar a una equació on el quocient depèn del paràmetre d'inhibició *in vitro* ( $K_i$  no unida) i de la concentració màxima d'inhibidor (fàrmac) trobada en plasma, tal i com s'indica a la secció 6.6. D'aquesta manera que es consideren pel càlcul, els valors de concentracions en plasma que es mostren a la Taula 49 de la secció 7.3.3, i en el cas de la XYL el valor de la concentració en sang, (s'assumeix un quocient plasma:sang 1:1).

Tal i com s'indica a la secció 6.6, quan el valor de  $R_{exp}$  és  $>1.1$  és predictiu d'interaccions per inhibició *in vivo*. En aquest treball, els casos on  $R_{exp}$  és  $>1.1$  són: KT amb CYP2B1/2 ( $R_{exp}=1.4$ ), amb CYP2C11 ( $R_{exp}=1.3$ ), i amb CYP3A1/2 ( $R_{exp}=2.8$ ); KTA amb CYP2B1/2 ( $R_{exp}=2.0$ ), amb CYP2C11 ( $R_{exp}=1.6$ ), i amb CYP2D1 ( $R_{exp}=1.2$ ); BN amb CYP3A1/2 ( $R_{exp}=3.4$ ); i XYL amb CYP2C ( $R_{exp}=3.0$ ), amb CYP2C11 ( $R_{exp}=7.7$ ), amb CYP2D1 ( $R_{exp}=4.7$ ), i amb CYP3A1/2 ( $R_{exp}=1.8$ ). Veure Taula 57.

En resum, de tots els fàrmacs estudiats, el FEN no presentaria risc d'interacció en les activitats enzimàtiques de les isoformes CYP450 estudiades.



## 9 CONCLUSIONS

Les conclusions que s'extreuen del treball realitzat són les següents:

1. S'ha posat a punt mètodes analítics per determinar els set metabòlits específics formats en les reaccions corresponents a les següents isoformes del CYP450: resorufina per CYP1A1/2, 7- $\alpha$ -hidroxitestosterona per CYP2A1/2, resorufina per CYP2B1/2, 16- $\alpha$ -hidroxitestosterona per CYP2C, 2- $\alpha$ -hidroxitestosterona per CYP2C11, dextrorfà per CYP2D1, 6-hidroxiclorzoxazona per CYP2E1 i 6- $\beta$ -hidroxitestosterona per CYP3A1/2.
2. S'ha posat a punt en el nostre laboratori dos mètodes per l'obtenció de microsomes hepàtics de rata, un basat en la precipitació en calci i l'altre en el mètode d'ultracentrifugació. Amb els dos mètodes es van obtenir els microsomes emprats per la realització d'aquest treball.
3. S'ha posat a punt i validat models d'inhibició enzimàtica, que permeten determinar la  $K_i$  dels fàrmacs en estudi sobre vuit isoformes CYP450 de rata, per regressions no-lineals simultànies (SNLR). Els models d'inhibició s'han desenvolupat a partir de les equacions de Michaelis-Menten i de Hill; aquestes últimes de forma innovadora, ja que no están descrites en la bibliografia. Els models s'han implementat en el software WinNonlin per la seva utilització rutinària.
4. Es proposa la utilització d'una anàlisi de la variància d'una via entre els quocients  $K_m/V_{max}$  i les concentracions de fàrmac com a eina de filtrat de les interaccions CYP-fàrmac no rellevants o inexistents amb la finalitat de reduir el número de càlculs posteriors.
5. El paràmetre  $IC_{50}$  no ha resultat ser un indicador prou predictiu de possibles interaccions *in vivo*. Es van predir cinc potencials interaccions per inhibició a partir de  $IC_{50}$ , set a partir de  $K_i$  i 11 a partir del quocients  $R_{exp}$ .
6. Els resultats del present treball permeten predir interaccions potencials *in vivo* en rata per inhibició, pels següents fàrmacs:

## Conclusions

- a. La Buprenorfina pot inhibir l'activitat del CYP3A1/2 ( $R_{exp}=3.4$ ;  $K_i=6.4$   $\mu\text{M}$ ).
  - b. El Ketoprofè pot inhibir l'activitat dels CYPs 2B1/2 ( $R_{exp}=1.4$ ;  $K_i=2777.3$   $\mu\text{M}$ ), 2C11 ( $R_{exp}=1.3$ ;  $K_i=4077.7$   $\mu\text{M}$ ) i 3A1/2 ( $R_{exp}=2.8$ ;  $K_i=639.5$   $\mu\text{M}$ ).
  - c. La Ketamina pot inhibir l'activitat dels CYPs 2B1/2 ( $R_{exp}=2.0$ ;  $K_i=35.9$   $\mu\text{M}$ ), 2C11 ( $R_{exp}=1.6$ ;  $K_i=62.6$   $\mu\text{M}$ ) i 2D1 ( $R_{exp}=1.2$ ;  $K_i=197.8$   $\mu\text{M}$ ).
  - d. La Xilacina pot inhibir l'activitat dels CYPs 2C ( $R_{exp}=3.0$ ;  $K_i=41.7$   $\mu\text{M}$ ), 2C11 ( $R_{exp}=7.7$ ;  $K_i=12.2$   $\mu\text{M}$ ), 2D1 ( $R_{exp}=4.7$ ;  $K_i=21.9$   $\mu\text{M}$ ) i 3A1/2 ( $R_{exp}=1.8$ ;  $K_i=98.9$   $\mu\text{M}$ ).
7. Dels fàrmacs estudiats, i segons els resultats obtinguts, l'analgèsic Fentanil es l'únic que no presentaria potencials inhibicions de les activitats de les vuit isoformes CYP450 estudiades, i per tant, seria un analgèsic d'elecció pels estudis de metabolisme en rata.

10 REFERÈNCIES

- ref. 1 *Murray R.* Metabolism of xenobiotics. Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Incorporated.2009.
- ref. 2 *Lake B.G.* Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. Biochemical Toxicology: A practical approach. Ed. IRL, Press, Oxford, Washintong D.C.1987.
- ref. 3 *Werck-Reochhart, D. and Feyereisen R.* Cytochromes P-450: a success story. *Genome Biology*.1:1-8, 2001.
- ref. 4 *David F.V. Lewis.* Cytochromes P450. Structure, function and mechanism..Ed. Taylor and Francis.2001.
- ref. 5 Cytochrome P450 Homepage:  
<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>.
- ref. 6 *Donato M.T.* Unidad de Hepatología experimental. Centro de Investigación. Hospital La Fe. Valencia. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?.2000.
- ref. 7 *Donato M.T. and Castell V.* Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism. *Clinical Pharmacokinetics*.42(2):153-178,2003.
- ref. 8 *Shiraki H. and Guengerich P.* Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-Cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 235(1):86-96,1984.
- ref. 9 *Orellana M. and Guajardo V.* Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*.132:85-94,2004.
- ref. 10 *Nebert D.W. and Nelson D.R.* P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods in Enzymology*.206:3-10,1991.
- ref. 11 *Mugford, C.A. & Kedderis, G.L.* Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metabolism Review*.30: 441-498,1998.
- ref. 12 *Furukawa T. and col.* Sex difference in the daily rhythm of hepatic P450 monooxygenase activities in rats is regulated by growth hormone release. *Toxicology and Applied Pharmacology*.161:219-224,1999.
- ref. 13 *Imaoka S. and col.* Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*.1097:187-192,1991.
- ref. 14 *Lutz M.* Effect of dietary oils, cholesterol and antioxidant vitamin supplementation on liver microsomal fluidity and xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*.42:350-359,1998.
- ref. 15 *Furukawa T. and col.* Sex difference in the daily rhythm of hepatic P450 monooxygenase activities in rats is regulated by growth hormone release. *Toxicology and Applied Pharmacology*.161:219-224,1999.

## Referències

- ref. 16 *Strobel H.W. and Dignam J.D.* Purification and properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Methods in Enzymology*.52:89-96,1978.
- ref. 17 *Newton D.J., Wang R.W. and Lu A.Y.H.* Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*.23(1):154-158,1994.
- ref. 18 *Foster R.T. and Jamali F.* High-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen enantiomers in human plasma and urine. *Journal of Chromatography*, 416:388-393,1987.
- ref. 19 *Menzel S., and col.* Is the inversion from R- to S-ketoprofen concentration dependent? Investigations in rats *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*.47:1267-1270,1994.
- ref. 20 *Foster R.T. and Jamali F.* Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metabolism and Disposition*.16(4 ):623-626,1988.
- ref. 21 *Meunier C.J. and Verbeek R.K.*Glucuronidation of R- and S-ketoprofen, acetaminophen, and diflunisal by liver microsomes of adjuvant-induced arthritic rats. *Drug Metabolism Disposition*.27:26-31,1999.
- ref. 22 *Rodgers T. and Rowland M.* Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharmaceutical Research*.24(5):918-932,2007.
- ref. 23 *Geisslinger G. and Menzel-Soglowek S.* Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of ketamine and norketamine in plasma. *Journal of chromatography B: Biochemical Sciences and Applications*.573(1):163-167, 1992.
- ref. 24 *Alfonso M. and col.* Validation of an EIA kit for determination of total thyroid hormones in rat serum. Effects of different anaesthetics. *Journal of Physiololgy Biochemistry*.54(1):15-22, 1998.
- ref. 25 *Yanagihara Y. and col.* Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolite, norketamine, in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 746:227-231, 2000.
- ref. 26 *Edwards S.R. and Mather L.E.* Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat. Indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion. *Life Sciences*.69:2051-2066, 2001.
- ref. 27 *Adams J.D. and col.* Studies on the biotransformation of ketamine. *Biomedical Mass Spectrometry*.8(11):527-538,1981.
- ref. 28 *Williams M.L. and col.* Effects of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. *Drug Metabolism and Disposition*.32 (8):786-793, 2004.
- ref. 29 *Bolze S. and Boulieu R.* HPLC determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in plasma with a high-purity reversed-phase sorbent. *Clinical Chemistry*.44(3):560-564,1998.

- ref. 30 Gumbleton M. and Benet L.Z. Drug metabolism and laboratory anesthetic protocols in the rat: examination of antipyrine pharmacokinetics. *Pharmaceutical Research*,8(4):544-546,1991.
- ref. 31 Van Pelt Ll.F. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.171(9):842-844, 1997.
- ref. 32 Smiler K.L. and col. Tissue response to intramuscular and intraperitoneal injections of ketamine and xylazine in rats. *Laboratory Animal Sciences*.40(1):60-64,1990.
- ref. 33 Pedraz J.L. The biotransformation kinetics of ketamine *in vitro* in rabbit liver and lung microsomes. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*.11(1):9-16,1986.
- ref. 34 Hedenqvist P. and col. Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats. *Laboratory Animals*.34:207-211,2000.
- ref. 35 Björkman S. and Redke F. Clearance of fentanyl, alfentanil, methohexitone, thiopentone and ketamine in relation to estimated hepatic blood flow in several animal species: application to prediction of clearance in man. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacology*.52:1065-1074,2000.
- ref. 36 Livingston A. and Waterman A.E. The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism. *British Journal of Pharmacokinetics*.64:63-69,1978.
- ref. 37 Marietta M.P. and col. Biodisposition of ketamine in the rat: self-induction of metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.198(3):536-544,1975.
- ref. 38 Meneguz A. and col. Influence of urethane and ketamine on rat hepatic cytochrome P450 *in vivo*. *Experimental and Toxicologic Pathology*.54:392-396,1999.
- ref. 39 Brewster D. and col. Biliary excretion, metabolism and enterohepatic circulation of buprenorphine. *Xenobiotica*.11(3):189-196,1981.
- ref. 40 Arnould J.F. and Pinaud M. Pharmacologie de la buprénorphine. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*.10:559-564,1991.
- ref. 41 Ohtani M. and col. Pharmacokinetic analysis of enterohepatic circulation of buprenorphine and its active metabolite, norbuprenorphine, in rats. *Drug Metabolism and Disposition*.22(1):2-7,1993.
- ref. 42 Kobayashi K. and col. Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. Short Communication. *Drug Metabolism and Disposition*.26(8):818-821,1998.
- ref. 43 Umehara K. and col. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 by buprenorphine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*.25(5):682-685,2002.



## Referències

- ref. 44 *Simpson D.P.* Prolonged (12 hours) intravenous anesthesia in the rat. *Laboratory Animal Science*.47(5): 519-523,1997.
- ref. 45 *Ohtani M. and col.* Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*.281(1):428-433,1997.
- ref. 46 *Takahashi Y. and col.* Pharmacokinetics of buprenorphine hydrochloride (BN.HCl)(1):absorption, distribution, metabolism and excretion after percutaneous (TSN-09:BN.HCl containing tape application) or subcutaneous administration of BN.HCl in rats. *Xenobiotic, Metabolism and Disposition*.16(6):569-583,2001.
- ref. 47 *Ekins S. and col.* Three-dimensional-quantitative structure activity relationship analysis of cytochrome P-450 3A4 substrates. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.291(1):424-433,1999.
- ref. 48 *Ho J.W. and Moody E.* Determination of tolbutamide hydroxylation in rat liver microsomes by high-performance liquid chromatography: effect of psychoactive drugs in *in vitro* activity. *Life Sciences*.52:21-28,1992.
- ref. 49 *Meuldermans W.E.G. and col.* Plasma protein and distribution of fentanyl, sufentanil, alfentanil and lofentanil in blood. *Archives Internationales Pharmacodynamie*. 257:4-19,1982.
- ref. 50 *Feierman D.E. and Lasker J.M.* Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes. Role of CYP3A4. *Drug Metabolism and Disposition*.24(9): 932-939,1996.
- ref. 51 *Björkman S. and col.* Comparative tissue concentration profiles of fentanyl and alfentanil in humans predicted from tissue/blood partition data obtained in rats. *Anesthesiology*.72:865-875,1990.
- ref. 52 *Feierman D.E.* The effect of paracetamol (acetaminophen) on fentanyl metabolism *in vitro*. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*.44:560-563,2000.
- ref. 53 *Hug C.C. and col.* Tissue redistribution of fentanyl and termination of its effects in rats. *Anesthesiology*.55:369-375,1981.
- ref. 54 *Feierman D.E.* Identification of cytochrome P450 3A1/2 as the major P450 isoform responsible for the metabolism of fentanyl by rat liver microsomes. *Anesthesia and Analgesia*.82:936-941, 1996.
- ref. 55 *Chamberlain P.L.* Xylazine. FDA, Center of Veterinary Medicine. 2002.
- ref. 56 *Park H-Y. and Choi S-O.* The metabolism of xylazine in rats. *Archives of Pharmacal Research*.14(4):346-351,1991.
- ref. 57 *Choo H-Y P.* Tissue concentration of xylazine and its metabolite in rats. *Korean Journal of Toxicology*. Vol. 9, No. 2:147-152. 1993.
- ref. 58 *Yasuhara K. and col.* Toxicity and blood concentration of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline, in rats after single or continuous oral administrations. *The Journal of Toxicological Sciences*.25(2):105-113,2000.

- ref. 59 *Mutlib A.E. and col.* Characterization of metabolites of xylazine produced *in vivo* and *in vitro* by LC/MS/MS and by GC/MS. *Drug Metabolism and Disposition*.20(6):840-848,1992.
- ref. 60 *Kazuo Y. and col.* Toxicity and blood concentrations of xylazine and its metabolite 2,6-dimethylaniline in rats after single or continuous oral administrations. *The Journal of Toxicological Sciences*.25:105-113,2000.
- ref. 61 *Kakkar T. and col.* Evaluation of a minimal experimental design for determination of enzyme kinetic parameters and inhibition mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.293(3):861-869,2000.
- ref. 62 *Segel I.H.* Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley and sons, Inc. N.Y. USA. 1993.
- ref. 63 *De Arriaga M.D. and col.* Manual de ejercicios de cinética enzimática. Ed. Universidad y León. 1998.
- ref. 64 *Houston J.B. and Kenworthy K.E.* *In vitro-in vivo* scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten Model. *Drug Metabolism and Disposition*.28(3): 246-254,1999.
- ref. 65 *Tran T.H. and col.* Microsomal protein concentration modifies the apparent inhibitory potency of CYP3A inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition*.30:1441-1445,2002.
- ref. 66 *Lin J.H.* Applications and limitations of interspecies scaling and *in vitro* extrapolation in pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition*.26(12):1202-1212,1998.
- ref. 67 *Obach R.S.* The importance of nonspecific binding in *in vitro* matrices, its impact on enzyme kinetic studies of drug metabolism reactions, and implications for *in vitro-in vivo* correlations. *Drug Metabolism and Disposition*.24(10):1047-1049,1996.
- ref. 68 *Obach R.S.* Nonspecific binding to microsomes: impact on scale-up of *in vitro* intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of warfarin, imipramine, and propranolol. *Drug Metabolism and Disposition*.25(12):1359-1369,1997.
- ref. 69 *Munson P.J. and Rodbard D.* An exact correction to the "Cheng-Prusoff" correction. *Journal of Receptor Research*.8:533-546,1988.
- ref. 70 *Cheng Y. and Prusoff W.H.* Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*.22:3099-3108.1973.
- ref. 71 "In vitro interactions of Ketamine, Xylazine, Buprenorphine, Fentanyl and Ketoprofen with CYP2B and 3A in rat liver microsomes". 18<sup>th</sup> International Conference in Cytochrome P450. Dijon, França, 2003. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.

## Referències

- ref. 72 "In vitro interactions of Ketamine an Ketoprofen with different Cytochrome P450 isoforms in rat liver microsomes". 12<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450. La Grande Motte. França, 2001. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.
- ref. 73 Schenkman J.B. and Cinti D.L. Preparation of microsomes with calcium. *Methods in Enzymology*.52:83-89,1998.
- ref. 74 Litterst Ch.L. and col. Drug metabolism by microsomes from hepatic organs of rat and rabbit prepared by calcium aggregation. *Life Sciences*.17:813-818,1975.
- ref. 75 Lowry O.H. and col. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.193(1):265-275,1951.
- ref. 76 Omura T. and Sato R. Isolation of Cytochromes P-450 and P-420. *Methods in Enzymology*. 10:556-561,1967.
- ref. 77 Omura T. and Sato R. A new Cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237:1375-1376,1962.
- ref. 78 Guengerich F.P. and Martin M.V. Purification of Cytochromes P450. Rat an human hepatic forms. *Methods in Molecular Biology*,107:35-53,1998.
- ref. 79 Ryan D.E. and col. Purification, characterisation and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P-450 isozymes. *Xenobiotica*.12(11):727-744,1982.
- ref. 80 Joly, J.G. and col. Cytochrome P-450 measurement in rat liver homogenate and microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*.3(6): 577-586,1975.
- ref. 81 Omura T. and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.*The Journal of Biological Chemistry*.239(7):2379-2385,1964.
- ref. 82 Funae Y. and Imaoka S. Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated male rats. *Biochimica et Biophysica Acta*.926:349-358,1987.
- ref. 83 Matsubara T. and col. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Analytical Biochemistry*.75(2):596-603,1976.
- ref. 84 Vuppugalla R. and Mehvar R. Enzyme-selective effects of nitric oxide on affinity and maximum velocity of various rat cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition*.33:829-836,2005.
- ref. 85 Litterst Ch.L. and col. Drug metabolism by microsomes from extrahepatic organs of rat and rabbit prepared by calcium aggregation. *Life Sciences*.17:813-818,1975.
- ref. 86 Jaruratanasirikul S. and col. The inhibitory effect of amiodarone and desethylamiodarone on dextromethorphan O-demethylation in human and rat liver microsomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.46:933-935,1994.

- ref. 87 *Kuhn U.D. and col.* Induction of cytochrome P450 1A1 in rat liver slices by 7-ethoxycoumarin and 4-methyl-7-ethoxycoumarin. *Experimental and Toxicologic Pathology*.50:491-496,1998.
- ref. 88 *Burke M.D. and col.* Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*.2(6):583-588,1974.
- ref. 89 *Burke M.D. and col.* Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction. *Drug Metabolism and Disposition*.5(1):1-8 1977.
- ref. 90 *Turini A. and col.* Oxidation of methyl- and ethyl- tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms. *Archives of Toxicology*.72:207-214,1998.
- ref. 91 *Howard L.A.and col.* Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.299(2):542-550,2001.
- ref. 92 *Korzekwa K.R. and col.* Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models:evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry*.37:4137-4147,1998.
- ref. 93 *Ekins S. and col.* Autoactivation and activation of the cytochrome P450s. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*.36(12):642-651.1998.
- ref. 94 *Geng W.* A method for identification of inhibition mechanism and estimation of  $K_i$  in *in vitro* enzyme inhibition study. *Drug Metabolism and Disposition*.31:1456-1457,2003.
- ref. 95 *Kakkar T. and col.* Estimation of  $K_i$  in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metabolism and Disposition*.27(6):756-762, 1999.
- ref. 96 *Car R.Z. and col.* IC50-to- $K_i$ : a web-based tool for covering IC50 to  $K_i$  values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*:1-5,2009.
- ref. 97 “Role of Ketamine non-specific binding to rat microsome incubations and its impact on the inhibition parameters of cytochromes P450: 1A, 2A, 3A1, 2B, 2C, 2C11 and 2D1”. 9<sup>th</sup> European ISSX Meeting. Manchester, UK, 2006. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.
- ref. 98 *Hallifax and col.* Binding of drugs to hepatic microsomes:comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement. *Drug Metabolism and Disposition*.34(4):724-726,2006.
- ref. 99 *Austin R.P. and col.* Response to “binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement”. *Drug Metabolism and Disposition*.34(4):727. 2006.

- ref. 100 Austin R.P. and col. The influence of nonspecific binding microsomal binding on apparent clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metabolism and Disposition*.30(12):1497-1503,2002.
- ref. 101 Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software v8.14 for Solaris©.:1994-2005. ACD/Labs.
- ref. 102 Turner D.B. and col. Prediction of non-specific hepatic microsomal binding from readily available physicochemical properties. 9<sup>th</sup> European ISSX Meeting. Manchester UK, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> Juny 2006.
- ref. 103 De Buck. S.S. and col. The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metabolism and Disposition*.35(4):649-659,2007.
- ref. 104 Anderson T.B. and col. An evaluation of the *in vitro* metabolism data for predicting the clearance and drug-drug interaction potential of CYP2C9 substrates. *Drug Metabolism Disposition*.32(7):715-721,2004.
- ref. 105 Gao H. and col. *In silico* modeling of nonspecific binding to human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*.36(10):2130-2135,2008.
- ref. 106 Emoto C. and col. Utilization of estimated physicochemical properties as an integrated part of predicting hepatic clearance in the early drug-discovery stage: impact of plasma and microsomal binding. *Xenobiotica*.39(3):227-235, 2009.
- ref. 107 McLure J.A. and col. Nonspecific binding of drugs to human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*.49:452-461,2000.
- ref. 108 Venkatakrishnan K. and col. Microsomal binding of amitriptyline: effect on estimation of enzyme kinetic parameters *in vitro*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.293(2):343-350.2000.
- ref. 109 Margolis J.M. and Obach R.S. Impact of nonspecific binding to microsomes and phospholipid on the inhibition of cytochrome P4502D6: implications for relating *in vitro* inhibition data to *in vivo* drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*.31(5):606-611, 2003.
- ref. 110 De Buck S.S. and col. The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metabolism and Disposition*.35(4):649-659, 2007.
- ref. 111 Woon-Gye Ch. and col. Involvement of CYP3A1, 2B1, and 2E1 in C-8 hydroxylation and CYP 1A2 and flavin-containing monooxygenase in N-demethylation of caffeine: identified by using inducer treated rat liver microsomes that are characterized with testosterone metabolic patterns. *Chemico-Biological Interactions*.113:1-14, 1998.
- ref. 112 Steensma A. and col. Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, Cynomolgus monkey and human precision-cut liver slices. *Xenobiotica*.24(9):1-14, 1994.

## *Referències*

- ref. 113 *Feierman D.E.* Identification of cytochrome P450 3A1/2 as the major P450 isoform responsible for the metabolism of fentanyl by rat liver microsomes. *Anesthesia and Analgesia*.82:936-941, 1996.
- ref. 114 Guidance for industry. Drug interactions studies. Study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. FDA.Febrer 2012.
- ref. 115 *Bjornsson T.D.* The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metabolism and Disposition*.31(7):815-832, 2003.



### Annex 1 Model d'Inhibició Enzimàtica Competitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors

Model 1

```

remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICÓ ENZIMÀTICA COMPETITIVA M-M
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 3
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
F=Vm*x/((KM*(1+INH1/Ki)+x)
END
FUNCTION 2
F=Vm*x/((KM*(1+INH2/Ki)+x)
END
FUNCTION 3
F=Vm*x/((KM*(1+INH3/Ki)+x)
END
FUNCTION 4
F=Vm*x/((KM*(1+INH4/Ki)+x)
END
FUNCTION 5
F=Vm*x/((KM*(1+INH5/Ki)+x)
END
remark - end of model
EOM

```



**Annex 2 Model d'Inhibició Enzimàtica No Competitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors**

Model 1

```
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA NO-COMPETITIVA
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 3
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
F=Vm*x/((KM*AMT1)+(x*AMT1))
END
FUNCTION 2
AMT2=(1+(INH2/Ki))
F=Vm*x/((KM*AMT2)+(x*AMT2))
END
FUNCTION 3
AMT3=(1+(INH3/Ki))
F=Vm*x/((KM*AMT3)+(x*AMT3))
END
FUNCTION 4
AMT4=(1+(INH4/Ki))
F=Vm*x/((KM*AMT4)+(x*AMT4))
END
FUNCTION 5
AMT5=(1+(INH5/Ki))
F=Vm*x/((KM*AMT5)+(x*AMT5))
END
remark - end of model
EOM
```

### Annex 3 Model d'Inhibició Enzimàtica Mixta Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors

```

Model 1
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA MIXTA
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 4
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki', 'a'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5 = CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
a = P(4)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
AMT2=(1+(INH1/(a*Ki)))
F=Vm*x/((KM*AMT1)+(x*AMT2))
END
FUNCTION 2
AMT3=(1+(INH2/Ki))
AMT4=(1+(INH2/(a*Ki)))
F=Vm*x/((KM*AMT3)+(x*AMT4))
END
FUNCTION 3
AMT5=(1+(INH3/Ki))
AMT6=(1+(INH3/(a*Ki)))
F=Vm*x/((KM*AMT4)+(x*AMT6))
END
FUNCTION 4
AMT7=(1+(INH4/Ki))
AMT8=(1+(INH4/(a*Ki)))
F=Vm*x/((KM*AMT7)+(x*AMT8))
END
FUNCTION 5
AMT9=(1+(INH5/Ki))
AMT10=(1+(INH5/(a*Ki)))
F=Vm*x/((KM*AMT9)+(x*AMT10))
END
remark - end of model
EOM

```

**Annex 4 Model d'Inhibició Enzimàtica Acompetitiva Deduït de l'Equació de Michaelis-Menten per 5 Concentracions d'Inhibidors**

Model 1

```
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA ACOMPETITIVA PER 5 CONCENTRACIONS
D'INHIBIDORS
remark -
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 3
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
F=Vm*x/((KM)+(x*AMT1))
END
FUNCTION 2
AMT2=(1+(INH2/Ki))
F=Vm*x/((KM)+(x*AMT2))
END
FUNCTION 3
AMT3=(1+(INH3/Ki))
F=Vm*x/((KM)+(x*AMT3))
END
FUNCTION 4
AMT4=(1+(INH4/Ki))
F=Vm*x/((KM)+(x*AMT4))
END
FUNCTION 5
AMT5=(1+(INH5/Ki))
F=Vm*x/((KM)+(x*AMT5))
END
remark - end of model
EOM
```

### Annex 5 Model d'Inhibició Enzimàtica Competitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors

```

Model 1
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA COMPETITIVA SIGMOIDAL
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 4
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki', 'gamma'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
gamma = P(4)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT1)+x**gamma)
END
FUNCTION 2
AMT2=(1+(INH2/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT2)+x**gamma)
END
FUNCTION 3
AMT3=(1+(INH3/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT3)+x**gamma)
END
FUNCTION 4
AMT4=(1+(INH4/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT4)+x**gamma)
END
FUNCTION 5
AMT5=(1+(INH5/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT5)+x**gamma)
END
remark - end of model
EOM

```

**Annex 6 Model d'Inhibició Enzimàtica No Competitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors**

```
Model 1
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA NO-COMPETITIVA SIGMOIDAL
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 4
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki', 'gamma'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
gamma = P(4)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT1)+(x**gamma*AMT1))
END
FUNCTION 2
AMT2=(1+(INH2/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT2)+(x**gamma*AMT2))
END
FUNCTION 3
AMT3=(1+(INH3/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT3)+(x**gamma*AMT3))
END
FUNCTION 4
AMT4=(1+(INH4/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT4)+(x**gamma*AMT4))
END
FUNCTION 5
AMT5=(1+(INH5/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma*AMT5)+(x**gamma*AMT5))
END
remark - end of model
EOM
```

### Annex 7 Model d'Inhibició Enzimàtica Acompetitiva Deduït de l'Equació de Hill per 5 Concentracions d'Inhibidors

```

Model 1
remark *****
remark Developer:
remark Model Date:
remark Model Version: 1.0
remark *****
remark
remark - MODEL D'INHIBICIÓ ENZIMÀTICA SIGMOIDAL
remark - PER 5 CONCENTRACIONS D'INHIBIDOR
COMMANDS
NFUN 5
NPARAMETERS 4
PNames 'Vm', 'Km', 'Ki', 'gamma'
NCONSTANTS 5
END
remark - define temporary variables
TEMPORARY
INH1 = CON(1)
INH2 = CON(2)
INH3 = CON(3)
INH4 = CON(4)
INH5= CON(5)
Vm = P(1)
Km = P(2)
Ki = P(3)
gamma = P(4)
END
remark - define model equation
FUNCTION 1
AMT1=(1+(INH1/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma)+(AMT1*x**gamma))
END
FUNCTION 2
AMT2=(1+(INH2/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma)+(AMT2*x**gamma))
END
FUNCTION 3
AMT3=(1+(INH3/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma)+(AMT3*x**gamma))
END
FUNCTION 4
AMT4=(1+(INH4/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma)+(AMT4*x**gamma))
END
FUNCTION 5
AMT5=(1+(INH5/Ki))
F=Vm*x**gamma/((KM**gamma)+(AMT5*x**gamma))
END
remark - end of model
EOM

```



**Annex 8 Posters Relacionats amb el Treball i Presentats a Diferents Congressos**

- *“Role of Ketamine non-specific binding to rat microsome incubations and its impact on the inhibition parameters of cytochromes P450: 1A, 2A, 3A1, 2B, 2C, 2C11 and 2D1”*. 9<sup>th</sup> European ISSX Meeting. Manchester, UK, 2006. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.
- *“In vitro interactions of Ketamine, Xylazine, Buprenorphine, Fentanyl and Ketoprofen with CYP2B and 3A in rat liver microsomes”*. 18<sup>th</sup> International Conference in Cytochrome P450. Dijon, França, 2003. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.
- *“In vitro interactions of Ketamine an Ketoprofen with different Cytochrome P450 isoforms in rat liver microsomes”*. 12<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450. La Grande Motte. França, 2001. M.C.Gómez, J.Solà, C.Peraire and R.Obach.