

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA

ABSORCIÓN DEL SALBUTAMOL: ESTUDIOS “IN SITU” E
“IN VITRO”. INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE
SECRECIÓN

BELÉN VALENZUELA JIMÉNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de Juny de 2002 davant un tribunal format per:

- Dra. Dña. Marina Herráez Domínguez
- Dr. D. Vicente G. Casabó Alós
- Dra. Dña. Regina Lázaro Gistau
- Dr. D. Domingo Baretino Fraile
- Dr. D. Julio Prieto Fernández

Va ser dirigida per:

Prof. Dra. Adela Martín Villodre y Dra. Amparo Nácher Alonso

©Copyright: Servei de Publicacions
Belén Valenzuela Jiménez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5589-X

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

***Absorción del salbutamol: estudios “in situ” e
“in vitro”. Influencia de los procesos de secreción.***

Memoria que para optar al grado
de Doctor en Farmacia, presenta:

Belén Valenzuela Jiménez

Valencia, 2002.



Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Las que suscriben, D^a Adela Martín Villodre, Doctora en Farmacia y Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y D^a Amparo Nácher Alonso, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Doctorado realizada por Dña. Belén Valenzuela Jiménez titulada: *Absorción del salbutamol : estudios "in situ" e "in vitro". Influencia de los procesos de secreción* ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos para su juicio y calificación

Lo que suscriben en Valencia, a 22 de Febrero de 2002.

Fdo. Dra. Adela Martín Villodre

Fdo. Dra. Amparo Nácher Alonso



Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la ayuda de una beca de investigación "V SEGLES", para la formación de investigadores y personal docente, concedida por la Universidad de Valencia.

Este trabajo forma parte del proyecto SAF 97-250 financiado por la CICYT del Ministerio de Educación y Cultura de España.

Una vez finalizada la redacción de esta Memoria, llega el momento de expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de algún modo me han ayudado en su realización. Sin ninguna duda, es la parte más difícil de este trabajo. Resulta complicado plasmar en unas líneas tantos pensamientos que en estos momentos pasan por mi cabeza.

En primer lugar quisiera darle las gracias al Dr. José María Plá Delfina. El destino ha querido que no puedas compartir estos momentos con nosotros, pero desde aquí te agradezco el haberme aceptado en el departamento y permitirme formar parte de tu numeroso grupo de colaboradores. Siempre seguiste el desarrollo de mi trabajo con interés y entusiasmo, y quiero agradecértelo sinceramente, allá donde estés.

A mi directora, Adela Martín, quiero darle las gracias por haber confiado en mí para la realización de este trabajo y su constante apoyo. Te agradezco el trato amable que me has brindado, tus buenos consejos y tu ayuda para que pudiera desarrollar mi labor dentro del departamento.

A mi directora y gran amiga, Amparo Nácher, quiero darle las gracias por los ratos que hemos pasado durante estos años. Has sido la persona con la que he compartido más horas de trabajo y de diversión en el departamento y eso hace que seas especial para mí. Desde aquellos primeros días en el laboratorio, hasta ponerle el punto final a esta Tesis Doctoral, me he sentido inmensamente afortunada de trabajar a tu lado. Sin ti, el camino hubiera sido mucho más duro.

A Vicente G. Casabó, quisiera agradecerle su colaboración en la parte estadística y matemática de esta Tesis Doctoral. Es agradable contar con una persona que te haga ver las cosas más complicadas de una forma sencilla, siempre con una sonrisa. Muchas gracias por preocuparte de mí y ayudarme.

A Matilde Merino, quiero agradecerle sus consejos y su ayuda desinteresada siempre que la he necesitado, sobre todo en estos últimos meses, cuando nuestra relación ha ido estrechándose hasta llegar a la confianza que ahora tenemos y espero sigamos manteniendo.

No puedo olvidarme de todos mis compañeros del laboratorio con los que he compartido muchas horas de trabajo y muy buenos ratos, especialmente quiero nombrar a Puri, Amparo M., Manoli, Ricardo y Marga, con los que he tenido más contacto profesional y también personal. Me he sentido muy a gusto entre vosotros. Tampoco puedo dejar de nombrar a Marina Herráez y a Virginia Merino, que han hecho muy agradables las horas de comidas y cafés.

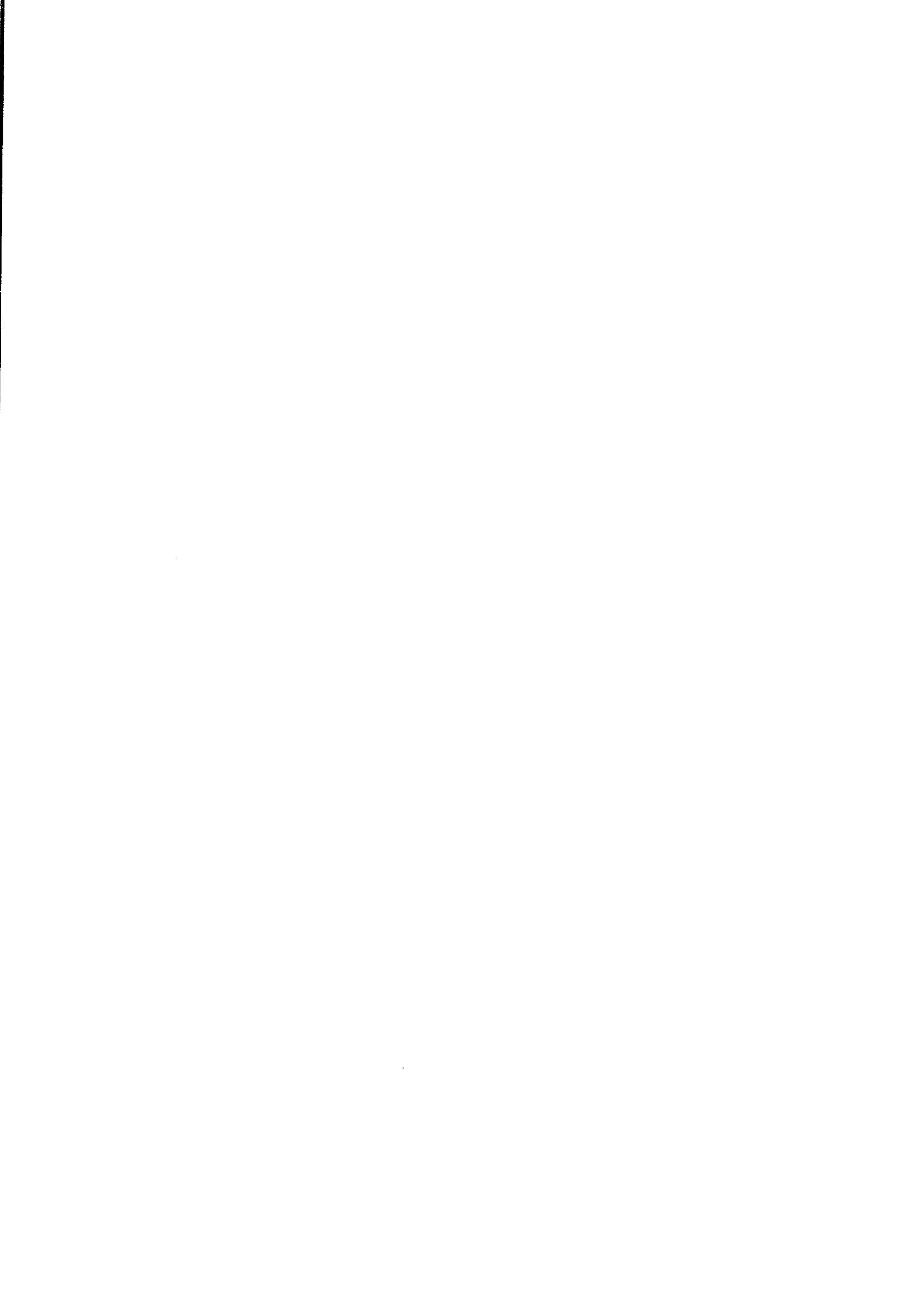
También quisiera agradecer a Domingo Baretino la oportunidad de poder trabajar bajo su supervisión y realizar en su laboratorio una parte importante de esta Memoria. Ha sido muy formativo para mí introducirme en el mundo de la biología molecular de tu mano. Muchas gracias por prestarme tu ayuda y por mostrarte siempre tan accesible.

Quiero agradecer a Giulia Ranaldi que aceptara ser mi supervisora durante mis estancias en su laboratorio y que me enseñara a trabajar con cultivos celulares. Gracias hacerme sentir como en casa cuando estuve en Roma y por estar tan pendiente de mí.

Asimismo, tengo un recuerdo extraordinario de Pilar, Carolina, Jose y Juana, a la que quiero agradecer especialmente la ayuda que siempre me ha prestado.

A mis padres quiero decirles que sin su esfuerzo durante los últimos años yo no hubiera conseguido realizar este trabajo. Os quiero agradecer la dedicación que me habéis brindado siempre y las palabras de ánimo que en todo momento he recibido de vosotros. Papá, gracias por insistir tanto en que siguiera con los estudios de Doctorado. Ahora me doy cuenta de lo importante que es llegar hasta aquí. Espero que estéis orgullosos de mí.

Por último, la persona más importante de mi vida: Esteban. Quiero agradecerte el que siempre me has hecho ver el lado bueno de todas las cosas. De ti he aprendido que la risa es la mejor terapia. Has sabido escucharme pacientemente, animarme, aconsejarme. Jamás has limitado mi formación aunque hemos tenido que estar separados durante meses. Sabías que era bueno para mí y siempre he contado con tu apoyo. Este trabajo es mérito de los dos. Tengo mucha suerte al tenerte a mi lado.



A mis padres

A Esteban

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1: ANTECEDENTES	7
1.1 SALBUTAMOL	9
1.1.1 Características generales	9
1.1.2 Propiedades fisicoquímicas	9
1.1.3 Mecanismo de acción	10
1.1.4 Indicaciones y utilidad terapéutica	10
1.1.5 Efectos secundarios	11
1.1.6 Precauciones	11
1.1.7 Interacciones	12
1.1.8 Farmacocinética	12
1.2 ABSORCIÓN INTESTINAL DE FÁRMACOS	15
1.2.1 Morfología de la membrana intestinal	15
1.2.2 Mecanismos de absorción	17
1.3 PROCESOS DE SECRECIÓN INTESTINAL DE FÁRMACOS: LA GLICO- PROTEÍNA P Y EL SISTEMA MRP	32
1.3.1 Determinación de sistemas secretores mediante el uso de cultivos celulares	38
1.3.2 Determinación biomolecular de sistemas secretores: reac- ción en cadena de la polimerasa (PCR)	42

Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1 COMPUESTOS ENSAYADOS.....	51
2.1.1 Fármaco.....	51
2.1.2 Sustancias inhibidoras.....	51
2.2 ENSAYOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL <i>IN SITU</i>	52
2.2.1 Animales de experimentación.....	52
2.2.2 Soluciones de trabajo	52
2.2.3 Osmolaridad	56
2.2.4 Técnica quirúrgica	57
2.2.5 Ensayo de absorción	62
2.2.6 Ensayo de reabsorción de agua	63
2.2.7 Ensayo de degradación	65
2.2.8 Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción	67
2.3 DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD <i>IN VITRO</i>	70
2.3.1 Soluciones de trabajo	71
2.3.2 Mantenimiento de las líneas celulares.....	72
2.3.3 Ensayo de permeabilidad	76
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	80
2.4.1 Elementos cromatográficos	80
2.4.2 Preparación de las muestras.....	82
2.5 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	82
2.5.1 Ensayos de linealidad.....	82
2.5.2 Ensayos de precisión y exactitud	84
2.5.3 Límite de cuantificación	84
2.6 ESTUDIO DEL MECANISMO DE INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO	85
2.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	87
2.7.1 Criterios de calidad de los ajustados.....	87

2.7.2 Criterios de selección del modelo	88
2.7.3 Pruebas de comparación de medias	90
2.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MDR	91
2.8.1 Preparación del RNA y síntesis del cDNA	91
2.8.2 Análisis semicuantitativo del mRNA mediante RT-PCR	92
Capítulo 3: RESULTADOS	95
3.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA	97
3.1.1 Rectas de calibración.....	97
3.1.2 Ensayos de precisión y exactitud.....	102
3.2 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN	108
3.3 ENSAYOS DE REABSORCIÓN DE AGUA.....	112
3.4 ENSAYOS DE ABSORCIÓN <i>IN SITU</i>	114
3.4.1 Absorción del salbutamol en intestino delgado de rata	114
3.4.2 Absorción del salbutamol en tramos intestinales	150
3.5 ESTUDIO DE PERMEABILIDAD DEL SALBUTAMOL <i>IN VITRO</i>	159
3.5.1 Ensayos con células Caco-2 TC7	159
3.5.2 Ensayos con células MDCK.....	163
3.6 ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE mRNA DE LA GLICOPROTEÍNA P MEDIAN- TE RT-PCR.....	167
Capítulo 4: DISCUSIÓN.....	169
4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	171
4.2 ESTUDIOS DE ABSORCIÓN: TÉCNICAS EXPERIMENTALES	172
4.2.1 Ensayos de absorción intestinal <i>in situ</i>	172
4.2.2 Ensayos de absorción intestinal <i>in vitro</i>	175

4.3 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN.....	178
4.4 ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA ABSORCIÓN IN- TESTINAL DEL SALBUTAMOL.....	178
4.4.1 Absorción intestinal del salbutamol en intestino delgado com- pleto de la rata.....	181
4.4.2 Ajustado diferencial de modelos cinéticos a los datos experi- mentales <i>in situ</i>	191
4.4.3 Absorción intestinal del salbutamol en diferentes tramos intes- tinales.....	198
4.5 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DEL SALBUTAMOL EN CULTIVOS CELULARES.....	199
4.6 ENSAYOS BIOMOLECULARES.....	203
Capítulo 5: RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	205
BIBLIOGRAFÍA.....	211

INTRODUCCIÓN

La vía oral para la administración de medicamentos es, sin duda, la más fisiológica y la más utilizada en la práctica clínica, siendo el intestino delgado el lugar de absorción por excelencia. De hecho, la mucosa del intestino delgado presenta particularidades anatomofisiológicas que la convierten en un lugar especializado en la función absorbente.

De ahí el interés que despiertan los estudios relacionados con los procesos de absorción gastrointestinal de los fármacos. Estos estudios suministran una clara idea de la biodisponibilidad que se puede obtener después de la administración oral de un medicamento, según las características inherentes a dicho proceso.

Los estudios de absorción adquieren especial importancia cuando los fármacos presentan peculiaridades en su comportamiento farmacocinético, por ejemplo cuando se observa una biodisponibilidad incompleta o una absorción irregular. En la mayor parte de los casos, este tipo de comportamiento puede explicarse después de un estudio detallado del proceso de absorción del fármaco.

En la administración oral de fármacos, el paso a través del epitelio intestinal es, junto con el posible metabolismo hepático, uno de los mayores impedimentos para que alcance, inalterado, la circulación general.

La capacidad de un xenobiótico para atravesar la barrera lipófila intestinal por difusión pasiva depende principalmente de sus características físico-químicas, como pueden ser su lipofilia, su peso molecular y su capacidad de ionización al pH del medio. También puede aprovechar los mecanismos especializados de transporte que el organismo ha puesto a punto para los principios inmediatos. Además de estos factores, el metabolismo hepático e intestinal pueden determinar la biodisponibilidad oral incompleta de los fármacos.

Existen otros procesos que también pueden modular la biodisponibilidad. En la actualidad, se sabe que una vez el fármaco se ha absorbido a través del enterocito puede sufrir una pérdida presistémica, debida a procesos activos de secreción

enterocito-lumen que se producen en las células intestinales, afectándose de este modo el paso completo del fármaco a la circulación sistémica. Los procesos de metabolismo hepático e intestinal conducen a una pérdida de biodisponibilidad en magnitud debido a que parte de la dosis administrada se biotransforma y no llega a la circulación general. Los procesos de secreción afectan tanto a la biodisponibilidad en magnitud como a la velocidad de absorción aparente.

En relación con los procesos de secreción intestinal, en la actualidad se conocen diferentes sistemas secretores que se encuentran en el tejido epitelial intestinal, y que limitan la incorporación al organismo de numerosos fármacos. Los dos sistemas de secreción intestinal más numerosos son el sistema MDR (Multidrug Resistance) y el MRP (Multi-drug resistance-associated protein).

El sistema MDR (glicoproteína P) es un transportador activo ATP-dependiente, que capta parte de las moléculas de fármaco que están atravesando la membrana de las células absorbentes y las devuelve a la luz intestinal, reduciendo, de este modo, el rendimiento del proceso de absorción y también el valor de la constante de velocidad de absorción aparente del fármaco. De hecho, este sistema secretor se identificó inicialmente como el sistema responsable de los fenómenos de resistencia a fármacos observados en tejidos tumorales.

La glicoproteína P es una proteína de acción más bien inespecífica que actúa frente a compuestos potencialmente tóxicos para el organismo. Se trata de un mecanismo de defensa frente a algunos xenobióticos. Debido a su inespecificidad, la glicoproteína P actúa sobre determinados fármacos impidiendo, de este modo, su completa absorción y disminuyendo, o incluso suprimiendo totalmente el efecto farmacológico. Por ello, en muchas ocasiones, esta proteína puede ser la causante, al menos en parte, de la baja biodisponibilidad oral de ciertos fármacos.

Dentro de la otra gran familia de transportadores, el MRP2 se localiza en la membrana apical de células de diferentes tejidos, entre los cuales se encuentra el tejido epitelial intestinal. Este sistema también modula la incorporación de

numerosos fármacos al organismo y, por ello, debe tenerse en consideración a la hora de determinar las causas que afectan a la incorporación de fármacos que presentan una biodisponibilidad baja e incompleta.

El trabajo desarrollado en la Memoria forma parte de una línea de investigación cuyo objetivo es estudiar la absorción oral de fármacos que presentan importantes pérdidas presistémicas cuando se administran por vía oral. Se enmarca dentro del proyecto *Desarrollo tecnológico y biofarmacéutico de formas bioadhesivas de liberación controlada (SAF97-0250)*. El objetivo final de este proyecto es la obtención de comprimidos bucoadhesivos que puedan paliar en parte las pérdidas que se producen en el proceso de absorción de estos fármacos. Ensayos previos en nuestro departamento con el salbutamol como fármaco de elección, mostraron que tras la administración oral a la rata de concentraciones elevadas de éste fármaco, los niveles plasmáticos determinados resultaron ser prácticamente indetectables. Ello llevó a considerar que el salbutamol podría ser sustrato de alguno de los sistemas de secreción activa que se encuentran en el epitelio intestinal y de los que, hasta ese momento, no se disponía de gran información.

El salbutamol es un agonista β_2 que se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento del asma bronquial por sus importantes efectos broncodilatadores. La incidencia del asma, sobre todo en niños, está sufriendo un crecimiento continuo. De hecho, según datos de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, se estima que la proporción de afectados hoy en día puede duplicar a la que había hace sólo dos décadas, siendo actualmente la enfermedad infantil más frecuente. Su biodisponibilidad oral, cuando se administra en forma de comprimidos, ha resultado ser muy baja, del orden del 50 % e incluso inferior.

El objetivo de esta Memoria se centra en determinar el origen de las pérdidas presistémicas del fármaco que conducen a su baja biodisponibilidad oral.

Introducción 6

Se ha considerado adecuado iniciar el estudio comprobando si los sistemas de secreción intestinal se encuentran o no involucrados en la absorción lenta e incompleta del salbutamol cuando se administra por vía oral, ya que esta circunstancia podría hacer aconsejable la utilización de nuevas vías de administración y nuevas formas farmacéuticas para el tratamiento de pacientes asmáticos, con el fin de obviar este efecto presistémico de pérdida y conseguir el máximo aprovechamiento terapéutico del fármaco.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1.1 SALBUTAMOL

1.1.1 Características generales

La adrenalina, la noradrenalina y la dopamina son tres sustancias naturales denominadas CATECOLAMINAS por poseer un grupo aromático, el 3,4-dihidroxifenilo, o catecol y una cadena lateral etilamino con diversas modificaciones. El salbutamol, es una catecolamina sintética que posee un grupo catecol al que se une una cadena etilamino. Es el 2-tertbutilamino-1-(4-hidroxi-3-hidroximetilfenil)-etanol (*Martindale, 1993*). Su estructura química, se refleja en la **Figura 1.1** (*Flórez J., 1997*).

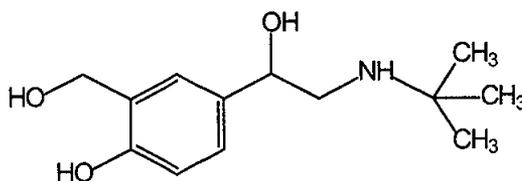


Figura 1.1 Estructura química del Salbutamol

El salbutamol es un β -agonista con actividad preferente β_2 . La estructura fundamental responsable de la acción simpaticomimética es el radical, que normalmente es aromático, unido a la cadena amínica, generalmente alifática, con el grupo amino en el carbono alfa (*Litter M., 1986*).

1.1.2 Propiedades físicoquímicas

El salbutamol puede encontrarse como base o en forma de sal. Para la realización del presente trabajo se ha utilizado como sulfato, teniendo en cuenta que 1.2 mg de salbutamol sulfato equivalen a 1 mg de salbutamol.

La fórmula molecular del salbutamol sulfato es $(C_{13}H_{21}NO_3)_2 H_2SO_4$. Su peso molecular es 576.7. Su pK_a oscila entre 9.3 y 10.3.

El salbutamol sulfato se presenta como polvo cristalino, casi blanco, inodoro y de ligero sabor amargo (*Farmacopea Europea, 1991*).

Es muy soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, cloroformo y éter y poco soluble en cloruro de metileno (*Castaño García T. y col., 1998*).

Para su correcta conservación deben utilizarse recipientes cerrados herméticamente y protegidos de la luz, siendo convenientes los frascos de cristal color topacio. La coloración del polvo indica una importante degradación del producto (*Castaño García T. y col., 1998; AHFS, 1998*).

1.1.3 Mecanismo de acción

Como se ha indicado, el salbutamol es un β -agonista que estimula preferentemente los receptores β_2 -adrenérgicos, mientras que apenas actúa sobre los receptores α -adrenérgicos.

Los agonistas de los receptores β -adrenérgicos estimulan la producción de AMP_c (adenosín-3'-5'-monofosfato) por activación de la enzima ADENILILCLASA. El aumento intracelular de AMP_c produce una estimulación de la Proteinquinasa A. A su vez, ésta última, es la responsable de la fosforilación de la quinasa de cadena ligera de la miosina. Cuando esta quinasa se encuentra fosforilada es inactiva ya que pierde afinidad por el complejo Ca²⁺- calmodulina. En consecuencia, se produce un menor acoplamiento del complejo actina-miosina que se traduce en una relajación de la musculatura lisa.

El AMP_c ejerce su máxima actividad estimuladora sobre los receptores β -adrenérgicos del tejido bronquial, uterino y células del músculo liso vascular (receptores β_2) mientras que sobre el músculo cardíaco su acción es menor.

1.1.4 Indicaciones y utilidad terapéutica

Al tener mayor afinidad por los receptores β_2 , se utiliza como broncodilatador, ya que disminuye la resistencia de las vías respiratorias al estimular, de forma selectiva, los receptores β -adrenérgicos del árbol bronquial. Además, inhibe la liberación de mediadores espasmógenos e inflamatorios de los mastocitos pulmonares e incrementa el aclaramiento mucociliar.

Se utiliza en la terapia del asma bronquial, broncoespasmo reversible asociado a E.P.O.C. (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) como bronquitis y enfisema pulmonar, bronquiectasia e infecciones pulmonares. También se utiliza en la profilaxis del asma bronquial y del broncoespasmo (*Castaño García T. y col., 1998*).

Se ha observado que presenta efecto vasodilatador en la circulación periférica y que puede disminuir, relativamente, la presión diastólica.

Está indicada su administración intravenosa en el tratamiento del parto prematuro sin complicaciones durante el último trimestre del embarazo, o cuando sea conveniente inhibir las contracciones uterinas.

Asimismo, se ha observado que induce hipopotasemia como resultado de la entrada del ión potasio en las células del músculo esquelético (*Velasquez y col., 1991*).

1.1.5 Efectos secundarios

Por lo general se tolera bien; normalmente las reacciones adversas que produce derivan de sus efectos simpaticomiméticos. Excepcionalmente, se han observado calambres musculares, temblor, palpitaciones, taquicardia, nerviosismo, náuseas, vómitos, hiper o hipotensión, insomnio y reacciones alérgicas. Su administración intravenosa rápida puede ocasionar vómitos y cefaleas. Cuando se administran dosis elevadas por vía intravenosa, con el fin de retrasar el parto prematuro, pueden aparecer náuseas y vómitos, efectos cardíacos y metabólicos, y edema pulmonar (*Castaño García T. y col., 1998*).

1.1.6 Precauciones

Al igual que con otros medicamentos, se recomienda precaución durante el primer trimestre de embarazo. Si se administra a pacientes embarazadas para tratar el broncoespasmo, de tenerse en cuenta que inhibirá las contracciones uterinas.

Está contraindicado en parto prematuro asociado con toxemia del embarazo o hemorragia antepartum, embarazo múltiple e historial de enfermedad coronaria.

En pacientes con hipertensión, insuficiencia coronaria, arritmias cardíacas, diabetes mellitus e hipertiroidismo, se aconseja vigilancia clínica debido a que el salbutamol puede agravar la enfermedad.

Los niños, especialmente los menores de 6 años, y los ancianos son más susceptibles a los efectos tóxicos del salbutamol, como taquicardia, insomnio y molestias gastrointestinales (*Castaño García T. y col., 1998*).

Al igual que otros estimulantes β -adrenérgicos, puede alterar los niveles de glucosa en sangre, por lo que se recomienda especial cuidado en pacientes diabéticos, sobre todo si éstos están también sometidos a terapia corticosteroidea sistémica.

1.1.7 Interacciones

En los tratamientos en los que se asocia el salbutamol con teofilina u otras xantinas aumenta el riesgo de hipopotasemia.

1.1.8 Farmacocinética

El modelo farmacocinético que describe mejor la evolución temporal del salbutamol en el organismo, parece ser el modelo bicompartimental (*Price A. H. y col., 1989*).

Se caracteriza por su baja biodisponibilidad oral, su amplia distribución a los tejidos y una unión a proteínas plasmáticas poco importante. Se elimina del organismo por excreción renal directa y por biotransformación hepática e intestinal. El principal metabolito es el 4'-O-sulfato que carece de actividad β -agonista.

1.1.8.1 Absorción

En el hombre, después de la administración oral de las dosis habituales de salbutamol (4-8 mg cada 6 horas), se obtienen niveles plasmáticos de 8-20

ng/mL (Goldstein D.A. y col., 1987; Lipworth B.J. y col., 1989; Kurosawa N. y col., 1993). Cuando se administra mediante inhalación a una dosis de 1200 µg/mL, los niveles plasmáticos se encuentran alrededor de 3 ng/mL (Clark D.J. y col., 1996).

A las dosis orales habituales, el t_{max} oscila entre 1 y 4 horas (Price A.H. y col., 1989; Taburet A.M. y col., 1994; Demnati R. y col., 1995), mientras que para la vía transpulmonar el t_{max} es, aproximadamente, de 10 minutos (Clark D.J. y col., 1996).

La biodisponibilidad oral absoluta del salbutamol es baja, probablemente por sufrir un importante efecto de primer paso hepático e intestinal (Morgan D.J. y col., 1986). En humanos, la biodisponibilidad oral es muy variable, oscilando entre el 10% y el 50 % (Hutching M.J. y col., 1987; Price A. H. y col., 1989; Taburet A. M. y col., 1994; Pacifici G.M. y col., 1997). Estudios realizados en conejos proporcionan valores de biodisponibilidad oral del 1% (Perreault S. y col., 1992). Por el contrario, cuando el salbutamol se administra por vía transpulmonar, la biodisponibilidad supera el 80% (Hindle M. y col., 1992) y por vía parenteral subcutánea, la biodisponibilidad es del orden del 94 % (Tamisier L. y col., 1992; Taburet A. M. y col., 1994).

1.1.8.2 Distribución

El salbutamol se distribuye rápidamente a los tejidos. En individuos sanos, después de la administración de una dosis única de salbutamol por vía intravenosa, se obtiene un volumen de distribución de 156 L (Taburet A.M. y col., 1994; Price A.H. y col., 1989).

El fármaco atraviesa la barrera placentaria. En ratas gestantes se recupera en plasma fetal un 10% de la dosis de fármaco administrado (Price A.H. y col., 1989; AHFS, 1998). Estudios realizados *in vitro* con placenta humana han demostrado que el 12% del salbutamol se transfiere desde la placenta al plasma fetal (Price A.H. y col., 1989). No se han encontrado evidencias de su paso a la leche materna (AHFS, 1998).

En cuanto a su paso a través de la barrera hematoencefálica, los datos disponibles son contradictorios. Algunos autores indican que el salbutamol no la atraviesa (AHFS, 1998), mientras que otros suponen que pasa un 5% de la concentración plasmática (Price A.H. y col., 1989).

El valor del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas varía en función de la técnica analítica utilizada para la determinación. La técnica de ultracentrifugación, utilizando concentraciones plasmáticas superiores a 50 µg/L, propone una unión del 7% (Morgan D.J. y col., 1986). Sin embargo, utilizando la técnica de diálisis de equilibrio, con concentraciones plasmáticas de 2 mg/L, se ha determinado una unión del 64% (Nandakumaran M. y col., 1981).

1.1.8.3 Eliminación

La eliminación del fármaco tiene lugar por excreción renal y también por metabolismo hepático e intestinal.

En general, los β-agonistas que tienen el núcleo aromático halogenado se biotransforman por oxidación y conjugación y sus semividas plasmáticas son largas. Por el contrario, los que tienen el núcleo aromático hidroxilado, como el salbutamol, solamente sufren conjugación y las semividas plasmáticas son relativamente cortas (Smith D.J., 1998).

Cuando el salbutamol se administra por inhalación, el enzima responsable de su metabolismo es la fenolsulfotransferasa (Eaton E.A. y col., 1996). Cuando se administra por vía oral, se biotransforma en gran medida en el hígado, siendo su metabolito principal el 4'-O-sulfato, que posee una actividad β-agonista muy reducida, casi nula (Hochhaus G. y col., 1992; Pacifici G.M. y col., 1997; AHFS, 1998). Además, el salbutamol, por esta vía, sufre un intenso efecto de primer paso por metabolismo intestinal (Morgan D.J. y col., 1986). El 64% del salbutamol administrado por vía intravenosa se excreta inalterado por orina. Por vía oral este valor disminuye al 35% (Morgan D.J. y col., 1986). Esta espectacular diferencia en los porcentajes de eliminación del fármaco según la vía de administración se estudiará con mayor profundidad en el *Capítulo 4*. Como se ha

indicado, cuando la administración es por vía parenteral, el principal mecanismo de eliminación es el renal (*Hochhaus G. y col., 1992*).

La semivida biológica del fármaco oscila entre 3 y 5 h. (*Goldstein D.A. y col., 1987; Morgan D.J. y col., 1986; Boulton D.W. y col., 1996; AHFS, 1998*).

En voluntarios sanos, los valores de aclaramiento plasmático del salbutamol se encuentran entre 28 y 30 L/h. En mujeres gestantes, cuando el fármaco se administra para prevenir el parto prematuro, el aclaramiento plasmático no se modifica (*Price A.H. y col., 1989; Hutching M.J y col, 1987*). En pacientes con insuficiencia renal, el aclaramiento disminuye hasta un valor de 10.02 L/h aproximadamente (*Rey E. y col., 1989*).

Parece ser que la secreción tubular activa juega un importante papel en la eliminación del salbutamol (*Price A.H. y col., 1989*).

El 4'-O-sulfato, producto del metabolismo del salbutamol en el organismo, tiene un aclaramiento renal del orden de 5.9 L/h, lo que indica que se elimina preferentemente por filtración glomerular, no sufriendo secreción tubular activa (*Morgan D.J. y col., 1986*).

Las tasas de extracción para cada uno de los principales sistemas eliminadores, son 0.92 en el intestino, 0.71 en el hígado y 0.47 en pulmón. (*Perreault S. y col., 1992*).

1.2 ABSORCIÓN INTESTINAL DE FÁRMACOS

1.2.1 Morfología de la membrana intestinal

La membrana del intestino delgado está especializada en la absorción de nutrientes y no nutrientes tal y como lo demuestra su estructura anatómico-fisiológica. Esta estructura es el resultado de diversas modificaciones que se desarrollan partiendo de la estructura cilíndrica fundamental, y que dotan a la mucosa del intestino delgado de una amplia superficie útil para la absorción. Estas modificaciones se describen resumidamente a continuación:

1º) Partiendo de la pared intestinal encontramos los *pliegues de Kerking*. Son plegamientos mucosos prominentes que aumentan el área de absorción alrededor de tres veces. Se pueden observar a simple vista en el duodeno y en el yeyuno.

2º) De los pliegues de Kerking parten los *villis* o *vellosidades intestinales*. Son proyecciones de la capa mucosa hacia el lumen, en forma de pequeños dedos de 1 mm de longitud. Aumentan unas diez veces la superficie intestinal respecto a los pliegues de Kerking. Están irrigados por una arteriola y una vénula que confluyen y forman una red de capilares, garantizando, de este modo, la eficacia de la absorción.

3º) En las paredes de las vellosidades intestinales aparecen las *células columnares* o *enterocitos*. En el borde apical de los enterocitos se encuentran los *microvilli*. Cada enterocito contiene alrededor de 1700 microvilli y a su conjunto se le denomina *borde en cepillo* o *superficie microvellosa*.

El resultado de estas modificaciones en el cilindro fundamental se traduce en un aumento de la superficie de la mucosa intestinal en unas 600 veces.

En el intestino delgado también se encuentran *poros acuosos* que se caracterizan por tener un diámetro pequeño y estar cargados. Esto representa una barrera en la absorción de moléculas e iones de tamaño superior a 200-250 Daltons ya que no son capaces de atravesar la barrera intestinal utilizando esta vía (Ballard S.T. y col., 1995).

Por último, debe indicarse que el intestino delgado presenta estructuras de membrana que actúan transportando específicamente tanto nutrientes (aminoácidos, azúcares, vitaminas) como xenobióticos estructuralmente relacionados con ellos. Estos *transportadores* se caracterizan por consumir energía y funcionar contra de gradiente de concentración.

En resumen, debido a la gran superficie de absorción que presenta el intestino delgado, junto con la elevada irrigación sanguínea y la presencia de transportadores específicos, es, la fracción del tracto gastrointestinal en la que el rendimiento neto de la absorción es mayor.

1.2.2 Mecanismos de absorción

Los mecanismos de absorción intestinal a través de las células epiteliales intestinales se pueden clasificar, de acuerdo con la morfología que presenta, en tres tipos: *Difusión pasiva*, *Mecanismos especializados de Transporte* y *Mecanismos combinados de Absorción Pasiva y Transporte Activo*.

Para caracterizar adecuadamente el mecanismo de absorción intestinal de un fármaco, es necesario que éste se encuentre completamente disuelto en el fluido luminal, ya que en caso contrario, el proceso de disolución puede ser un factor limitativo de la absorción, condicionando la cinética de ésta y enmascarando las características del proceso.

1.2.2.1 Mecanismo de absorción pasiva

Este mecanismo de absorción se caracteriza por no consumir energía metabólica ya que discurre a favor de gradiente de concentración. Engloba dos tipos principales de procesos, que se pueden dar o no simultáneamente: la difusión a través de membranas lipoideas, y el paso a través de los poros acuosos de la membrana.

Generalmente, la vía mayoritaria es la difusión del soluto a través de la membrana celular intestinal. Consiste en un reparto de las moléculas de soluto entre el fluido del lumen intestinal (fase acuosa) y la bícapa lipídica que forma la membrana celular (fase orgánica), de tal modo que las moléculas se desplazan desde la zona donde se encuentran más concentradas hasta aquella donde la concentración es menor. La velocidad de transporte neto del sustrato es proporcional a la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana intestinal.

Este mecanismo de absorción depende de las propiedades fisicoquímicas del soluto, en especial del grado de ionización y de la lipofilia puesto que en general sólo se absorbe la fracción no dissociada de la molécula que es la más lipófila. Se realiza a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, pero en especial en el intestino delgado, ya que por su estructura anatómica ofrece la mayor superficie útil de absorción en el menor volumen posible. Esto se debe, como se

ha comentado previamente, a que además de los pliegues de Kerking y de las vellosidades intestinales o villi que existen en todo el intestino, en el intestino delgado se encuentran microvellosidades o microvilli en la membrana apical de los enterocitos, con lo cual se consigue aumentar el área superficial del intestino delgado unas seiscientas veces respecto al cilindro fundamental (*Johnson L.R., 1987*).

El paso a través de poros acuosos se realiza a través de poros acuosos presentes en la membrana intestinal. Estos alcanzan un diámetro máximo de 1 nm, lo que limita el paso a moléculas de peso molecular superior a 200-250 Daltons, según la estructura molecular. En este caso, la difusión es una función inversa del tamaño molecular del fármaco. Este mecanismo de absorción se produce sobre todo a nivel del intestino delgado. En estómago y colon, los poros dejan de ser operativos debido a su reducido tamaño (*Plá Delfina J.M. y Moreno J., 1981*).

Podría considerarse en este epígrafe, la vía paracelular, en la que el fármaco difunde a través de las aberturas que dejan, por su parte superior, las uniones entre las células columnares adyacentes. Esta vía representa un porcentaje muy bajo de la absorción pasiva total y es utilizada por sustancias hidrófilas, de alto peso molecular.

Por último debe indicarse que también existen otros mecanismos de absorción pasiva como son la formación de pares de iones (lo que aumenta su lipofilia) o la pinocitosis, pero en general, resultan poco importantes.

1.2.2.1.1 Constante aparente de velocidad de absorción

Los procesos de absorción pasiva discurren a favor de gradiente de concentración y sin gasto de energía metabólica y, como cualquier proceso de difusión, están regidos por la Ley de Fick (*Bates T.R. y Gibaldi M., 1970; Dawson H., 1943*). El modelo más simple que describe el proceso de absorción pasiva es el que considera dos compartimentos acuosos separados por una barrera lipídica, la membrana celular, que el fármaco debe atravesar por difusión.

Cuando se aplica la segunda **Ley de Fick** al proceso de **difusión pasiva** se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dC}{dx} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Es esta ecuación dQ/dt representa la cantidad de compuesto que difunde a través de la membrana por unidad de tiempo, D es el coeficiente de difusión del compuesto a través de la membrana absorbente, S la superficie total de la membrana en contacto con el soluto y dC/dx el gradiente de concentración que se establece entre el lumen intestinal y el plasma sanguíneo.

Si se considera que la cantidad de soluto que difunde a través de la membrana (Q), es la misma que aparece en el lumen intestinal (Q_a), es decir:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dQ_a}{dt}$$

la ecuación adopta la siguiente expresión:

$$\frac{dQ_a}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dC}{dx} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Si en el gradiente de concentración se sustituyen las diferenciales por los incrementos, obtenemos:

$$\frac{dQ_a}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Considerando que ΔC es la diferencia de concentración del compuesto entre ambos lados de la membrana ($C_1 - C_2$) y que Δx puede asimilarse al espesor medio de la membrana (δ), se obtiene:

$$-\frac{dQ_a}{dt} = D \cdot S \cdot \frac{(C_1 - C_2)}{\delta} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

en la cual C_1 es la concentración de fármaco en la interfase lumen-membrana y C_2 la concentración en la interfase membrana-plasma. Si se tiene en cuenta que el soluto sufre un drenaje continuo por el plasma, C_2 puede considerarse despreciable frente a C_1 , de modo que:

$$-\frac{dQ_a}{dt} = D \cdot S \cdot \frac{C_1}{\delta} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Por otra parte, el coeficiente de reparto *in vivo* del fármaco (P_v), puede definirse como el cociente entre la concentración del soluto en la interfase lumen-membrana (C_1) y en el lumen intestinal (A) de manera que $C_1 = P_v \cdot A$, por lo que la ecuación adopta la siguiente forma:

$$-\frac{dQ_a}{dt} = \frac{D \cdot S \cdot P_v}{\delta} \cdot A \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Dividiendo por el volumen de fluido luminal (V_a) ambos miembros de la ecuación, se obtiene la expresión final que define la velocidad de absorción de un xenobiótico en función de su concentración en el lumen:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{D \cdot S \cdot P_v}{V_a \cdot \delta} \cdot A \quad \text{Ecuación 1.7}$$

Siguiendo un razonamiento similar, al aplicar la Ley de Fick a la **difusión convectiva** de xenobióticos a través de **poros acuosos**, se obtiene la siguiente expresión:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{D' \cdot S'}{V_a \cdot \delta \cdot \eta} \cdot A \quad \text{Ecuación 1.8}$$

en la que D' es el coeficiente de difusión del xenobiótico a través de los poros, S' la superficie total de los poros acuosos en la zona considerada, δ la longitud media de los poros (que coincide con el espesor medio de la membrana) y η la viscosidad del fluido luminal.

Al considerar conjuntamente ambos procesos se llega a la siguiente expresión general, representativa de la absorción pasiva de los xenobióticos:

$$-\frac{dA}{dt} = \left(\frac{D \cdot S \cdot P_v}{V_a \cdot \delta} + \frac{D' \cdot S'}{V_a \cdot \delta \cdot \eta} \right) \cdot A \quad \text{Ecuación 1.9}$$

Si se normalizan las condiciones experimentales de trabajo: técnica experimental, especie animal, lugar de absorción, solución de perfusión, etc, los parámetros incluidos en el paréntesis pueden considerarse constantes para un xenobiótico dado. Por tanto, pueden englobarse en el valor k_a que representa la *constante aparente de velocidad de absorción pasiva*:

$$-\frac{dA}{dt} = k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 1.10}$$

En esta ecuación, la velocidad de desaparición del xenobiótico del lumen intestinal es proporcional a su concentración, lo que indica que se trata de un proceso de primer orden.

Al integrar la *Ecuación 1.10* en el intervalo de tiempo definido entre 0 y t , se obtiene la siguiente expresión exponencial:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \qquad \text{Ecuación 1.11}$$

en la que A_0 representa la concentración del xenobiótico en el lugar de absorción a tiempo cero y A la concentración remanente al tiempo t considerado.

De esta forma, si se determinan las concentraciones remanentes en el lugar de absorción a distintos tiempos de toma de muestra, se puede obtener el valor de k_a mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados de dichas concentraciones frente al tiempo.

1.2.2.1.2 Coeficiente de permeabilidad efectiva

Cuando se trabaja con monocapas celulares en el estudio de los mecanismos de absorción de un fármaco, se utiliza como parámetro de absorción el coeficiente de permeabilidad efectiva P_{ef} .

Las líneas celulares se cultivan en soportes permeables (filtros de policarbonato) donde es posible obtener un sistema de dos compartimentos divididos por el monoestrato celular, que reproduce la situación estérica de la mucosa intestinal *in vivo* y favorece la formación de la organización polarizada de las células epiteliales. Esta metodología se describe ampliamente más adelante.

El compartimento dador contiene una cantidad conocida de fármaco que atraviesa la monocapa de células y aparece en el compartimento receptor. En dicho compartimento se valoran las cantidades a lo largo del tiempo. Cuando se alcanza el estado de equilibrio estacionario, es decir, cuando la velocidad de desaparición del fármaco del compartimento dador es igual a la de su aparición en el receptor, al aplicar la Ley de Fick, del mismo modo que se ha hecho en el apartado anterior al hablar de la constante aparente de velocidad de absorción, se cumple que:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dC}{dx} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

expresión en la que dQ/dt es la cantidad de fármaco que aparece en el compartimento receptor, S la superficie efectiva de contacto, dC es la diferencia de concentraciones de fármaco entre el compartimento dador y receptor y dx es el espesor que el soluto debe atravesar, que puede sustituirse por δ . En condiciones de sumidero perfecto, la concentración en el compartimento receptor es despreciable, de forma que dC puede sustituirse por C_d que representa la concentración de soluto en el compartimento dador:

$$\frac{dQ}{dt} = D \cdot S \cdot \frac{C_d}{\delta} \quad \text{Ecuación 1.12}$$

Se considera como coeficiente de permeabilidad efectiva el cociente entre el coeficiente de difusión y el espesor de la membrana, es decir, el camino recorrido por el fármaco por unidad de tiempo.

$$\frac{dQ}{dt} = P_{ef} \cdot S \cdot C_d \quad \text{Ecuación 1.13}$$

Al igual que en el caso de la constante aparente de velocidad de absorción, el coeficiente de permeabilidad efectiva depende de las características de la sustancia ensayada, así como del pH de la solución, de la temperatura, etc.

1.2.2.1.3 Relación entre la constante de velocidad de absorción (k_a) y el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{ef})

La relación entre k_a y P_{ef} puede deducirse fácilmente de las *Ecuaciones 1.10* y *Ecuación 1.13*, de tal modo que:

$$-\frac{dA}{dt} = k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 1.10}$$

$$\frac{dQ}{dt} = P_{ef} \cdot S \cdot C_d \quad \text{Ecuación 1.13}$$

si dividimos los dos miembros de la *Ecuación 1.13* por el volumen de disolución V , obtenemos:

$$\frac{dQ/dt}{V} = \frac{P_{ef} \cdot S \cdot C_d}{V}$$

o lo que es igual:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{P_{ef} \cdot S \cdot C_d}{V}$$

Sustituyendo dA/dt en la *Ecuación 1.10* obtenemos:

$$\frac{P_{ef} \cdot S \cdot C_d}{V} = k_a \cdot A$$

en la que podemos simplificar de ambos miembros la concentración (C_d y A) y despejando k_a obtenemos la ecuación que nos relaciona los dos parámetros:

$$k_a = \frac{P_{ef} \cdot S}{V} \quad \text{Ecuación 1.14}$$

Cuando se administra un volumen determinado de disolución (V), éste se dispone como un cilindro que se adapta al intestino, ocupando una longitud (L). Si se desarrollan las expresiones geométricas de ambas magnitudes se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$S = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot L \quad \text{Ecuación 1.15}$$

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad \text{Ecuación 1.16}$$

de forma que al realizar el cociente S/V se obtiene:

$$\frac{S}{V} = \frac{2 \cdot \pi \cdot r \cdot L}{\pi \cdot r^2 \cdot L} = \frac{2}{r} \quad \text{Ecuación 1.17}$$

Si el radio del intestino no cambia, el cociente S/V permanece constante y se puede sustituir en la *Ecuación 1.14* de la siguiente manera:

$$k_a = \frac{P_{ef} \cdot S}{V} = \frac{2 \cdot P_{ef}}{r} \quad \text{Ecuación 1.18}$$

1.2.2.2 Mecanismo especializado de transporte

Se ha observado que existen fármacos que a pesar de no poseer una lipofilia, tamaño molecular o estructura química adecuados para su absorción intestinal, presentan una constante de absorción mayor de la que cabría esperar de sus propiedades fisicoquímicas. En estos casos, debe sospecharse de la existencia de un mecanismo especializado de transporte, en el que el fármaco

aprovecha para su absorción los portadores, de naturaleza proteica, propios de nutrientes con los que mantiene una similitud estructural.

Los portadores son componentes de la membrana. Tienen la capacidad de tomar moléculas de soluto del lumen intestinal y formar un complejo reversible con ellas. El complejo atraviesa la membrana absorbente hasta llegar al citoplasma, donde libera al sustrato y de allí, pasa al torrente circulatorio. Desde el citoplasma, el portador regresa a la zona mucosa para repetir el proceso. Todo este mecanismo de transporte se desarrolla de manera unidireccional.

Los portadores presentan una gran especificidad en su unión a los sustratos, ya que reconocen determinados grupos funcionales de los mismos. Esto origina una competición por el portador entre sustratos que tengan cierta similitud estructural.

Además, los sistemas transportadores pueden llegar a saturarse, es decir, puede llegar un momento en el que todos los portadores estén unidos a una molécula de sustrato, llegándose en este momento a la velocidad máxima de transporte.

El **transporte activo** es el más común de los mecanismos de transporte especializados. Es capaz de actuar contra gradiente de concentración y depende de la energía metabólica de la célula, así como de la presencia de iones Na^+ en el medio. La existencia de transporte activo sólo se ha demostrado en el intestino delgado, y no se tiene evidencia, por el momento, de que tenga lugar en colon o en estómago.

En el intestino delgado existen diversos sistemas de transporte activo para la absorción de nutrientes, de forma que cada sistema de transporte actúa sobre un sustrato específico, de estructura química determinada. Existen portadores específicos para la absorción de la mayoría de nutrientes: aminoácidos, péptidos de pequeño tamaño, azúcares, vitaminas, sales biliares, etc. (*Ariens E.J., 1975*).

También se ha comprobado que algunos fármacos, de estructura química similar a estos nutrientes, son capaces de utilizar los mecanismos de transporte especializados de éstos. Como ejemplo se puede citar antibióticos β -lactámicos

(Stone B.G. y col., 1992) como el cefaclor, cefalexina, cefadroxilo; antiespásticos como el baclofeno (Merino M. y col., 1989); antiparkinsonianos como el L-Dopa (Sinko P.J. y col., 1987).

Los estudios de absorción activa han profundizado en la localización de los sistemas transportadores. Se ha observado que existen lugares en el intestino delgado en los que se produce una absorción selectiva de fármacos, es decir, la absorción de los mismos es más lucrativa en esas zonas que en zonas próximas. Estas regiones del intestino delgado se conocen con el nombre de **ventanas de absorción** activas y en ellas se concentran los portadores de dichos fármacos.

Se han identificado ventanas de absorción para fármacos como el diclofenaco (Peris Ribera J.E. y Plá Delfina J.M., 1985), el baclofeno (Merino M. y col., 1989) y la cefuroxima axetilo (Ruiz Balaguer N. y col., 1997), entre otros.

El proceso de absorción que se realiza por un mecanismo especializado de transporte, sigue una cinética de MICHAELIS-MENTEN, de acuerdo con la siguiente ecuación :

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Ecuación 1.19}$$

en la que v es la velocidad de la reacción, V_m representa la velocidad máxima que se puede alcanzar, K_m la constante de Michaelis-Menten, que equivale a la concentración de sustrato para la cuál la velocidad de transporte es la mitad de la velocidad máxima, y S la concentración de sustrato.

Esta ecuación se puede aplicar a los procesos de transporte mediados, considerando la concentración del sustrato (S) como la concentración de soluto en el lugar de absorción (A) y la velocidad del proceso v , como la variación de concentración del soluto en el lumen intestinal con relación al tiempo (dA/dt). En este caso, la ecuación se transforma en la siguiente expresión:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} \quad \text{Ecuación 1.20}$$

K_m es una constante que refleja la afinidad del sustrato por el sistema portador, de manera que un valor bajo de K_m indica una afinidad elevada del sustrato por el portador y, por el contrario, un valor alto de K_m indica baja afinidad del sustrato por el portador (Estrada E. y Hernández M., 1976).

La Ecuación 1.20 permite diferentes aproximaciones en función de las magnitudes relativas de K_m y A :

1) Cuando la concentración de fármaco en el lumen intestinal (A) es reducida, puede considerarse despreciable frente a la constante de Michaelis-Menten (K_m), de manera que la expresión anterior queda del siguiente modo:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m}{k_m} \cdot A = k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 1.21}$$

La velocidad del transporte en estas condiciones, es proporcional a la concentración de fármaco en el lumen intestinal, por lo que la cinética del proceso resulta análoga a la de difusión pasiva. Este proceso puede tratarse mediante una cinética de orden uno, en la que k_a representa la constante aparente de velocidad de absorción del fármaco.

2) Cuando la concentración de fármaco en el lugar de absorción es muy elevada, se produce la saturación del sistema enzimático portador, ya que el número de portadores es limitado y sus centros activos quedan completamente colapsados de fármaco. En este caso, el valor de K_m se hace despreciable frente al valor de la concentración remanente de sustancia en el lumen intestinal, con lo que el proceso de absorción se asemeja a una cinética de orden cero, donde la velocidad de absorción es constante e independiente de la concentración de fármaco en la luz intestinal. La Ecuación 1.20 se puede expresar del siguiente modo:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{A} = V_m = k_0 \quad \text{Ecuación 1.22}$$

en la que k_0 es la constante aparente de velocidad de absorción de orden cero.

Así pues, cuando el proceso de absorción se realiza mediante un mecanismo especializado de transporte, la velocidad de absorción se hace proporcional a la dosis administrada sólo cuando ésta es pequeña. A partir de una determinada concentración de fármaco, los sistemas portadores se saturan y se alcanza una velocidad de absorción constante e independiente de la concentración de fármaco presente en el lugar de absorción. Sólo en el caso de que el fármaco se encuentre en el lumen intestinal en concentraciones intermedias a los casos extremos comentados, la cinética de Michaelis-Menten, *Ecuación 1.20*, se pondrá de manifiesto en el proceso de absorción del fármaco.

La **difusión facilitada** se realiza a favor de un gradiente de concentración y no requiere consumo de energía metabólica. Un ejemplo de este proceso lo constituyen el transporte de ciertos azúcares y aminoácidos a través de la membrana de los eritrocitos.

Fenómenos de inhibición

En los mecanismos especializados de transporte intestinal, ponemos observar fenómenos de inhibición en el momento en que determinadas sustancias interfieren en el proceso de unión del fármaco a su sistema portador.

La inhibición puede ser reversible o irreversible. En el primer caso, el inhibidor provoca una modificación en los valores de los parámetros que caracterizan el transporte, es decir, en la V_m y en la K_m aparentes. Según sea la modificación en estos dos parámetros se pueden observar cuatro tipos de inhibición reversible que se esquematizan a continuación:

1ª) **COMPETITIVA**: V_m no varía y K_m aumenta.

2ª) **NO COMPETITIVA**: V_m disminuye y K_m no varía

3ª) **MIXTA**: V_m disminuye y K_m aumenta.

4ª) **ACOMPETITIVA**: V_m disminuye y K_m disminuye.

En la absorción intestinal, el mecanismo de inhibición más frecuente, es el competitivo. Las moléculas de sustrato y de inhibidor presentan una estructura química similar, de manera que ambas compiten por el mismo sitio activo en el portador. Como el número de portadores es limitado, cuando el inhibidor se une a ellos, reduce el número de portadores libres a los que unirse el sustrato, y por tanto, reduce su velocidad de transporte.

Si la inhibición resulta ser irreversible, las sustancias se combinan de manera covalente con el portador y lo inactivan de forma permanente.

1.2.2.3 Mecanismo combinado de Absorción Pasiva y Transporte Activo

Esta cinética es la que utilizan algunos fármacos y algunos azúcares como la glucosa y la galactosa. En ella, el proceso de absorción global consta de dos componentes. Uno de ellos saturable y específico (transporte activo) y otro lineal (difusión pasiva).

En estos casos, la expresión diferencial que define el proceso de absorción global es la siguiente:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 1.23}$$

Si se saca A factor común en esta ecuación se obtiene:

$$-\frac{dA}{dt} = \left(\frac{V_m}{K_m + A} + k_a \right) \cdot A \quad \text{Ecuación 1.24}$$

y por analogía con la ecuación diferencial de orden uno, se deduce que:

$$k_{ap} = \frac{V_m}{K_m + A} + k_a \quad \text{Ecuación 1.25}$$

En general, la contribución de ambos procesos está en función de los valores relativos de k_a , por una parte, y de V_m y K_m por otra.

Para una sustancia concreta, el predominio de uno u otro proceso dependerá de su concentración en el lumen intestinal. Cuando la concentración es baja, la contribución del componente activo es mucho más importante que el del componente pasivo. Por el contrario, la presencia de elevadas concentraciones de fármaco en el lugar de absorción conduce a la saturación del componente activo; de ahí que, normalmente, adquiera mayor importancia la difusión pasiva.

En ocasiones, se requiere caracterizar el proceso de difusión pasiva en presencia de transporte activo. Para ello, se puede recurrir a técnicas muy variadas. Algunas se basan en la eliminación del transporte activo, mediante la adición de inhibidores metabólicos o la utilización de soluciones carentes de ciertos iones inorgánicos como el sodio, esenciales para el transporte activo.

Otra forma de cuantificar la difusión pasiva es por saturación del transporte activo. Si se emplean concentraciones de fármaco lo suficientemente elevadas, los portadores se saturan y cualquier aumento de la velocidad de absorción dependerá, casi exclusivamente de la absorción pasiva.

1.3 PROCESOS DE SECRECIÓN INTESTINAL DE FÁRMACOS: LA GLICO-PROTEÍNA P Y EL SISTEMA MRP

En la Memoria que se presenta, se ha introducido este epígrafe dado que, a nuestro modo de ver, estos procesos forman parte del mecanismo de incorporación del salbutamol al organismo.

Numerosos fármacos son secretados, activa o pasivamente, desde la sangre hacia el lumen intestinal atravesando la membrana absorbente. Esta secreción intestinal reduce el rendimiento neto del proceso de absorción del fármaco, dando como resultado una biodisponibilidad oral baja. Por ello, resulta interesante determinar si la absorción lenta e incompleta de un fármaco se debe, al menos en parte, a la intervención de procesos de secreción intestinal, ya que la modulación posterior de estos últimos puede mejorar, al menos en teoría, la biodisponibilidad oral dichos fármacos.

Dentro de éstos fármacos se encuentran numerosos fármacos β -bloqueantes, que presentan una similitud estructural con el salbutamol (**Figura 4.1**). Aunque su acción farmacológica sea completamente diferente a la del salbutamol, esta gran similitud en su estructura química, hizo pensar que la variable e incompleta biodisponibilidad oral del salbutamol se produjera por la acción de sistemas activos de secreción intestinal, principalmente la glicoproteína P.

La **secreción pasiva** depende de la concentración de fármaco entre las capas serosa y mucosa. El grado de secreción viene determinado por las diferencias de pH, junto con el pK_a del fármaco y su lipofilia.

La **secreción intestinal activa** se caracteriza, en cambio, por una serie de propiedades:

- * el portador, de naturaleza proteica, es un componente de la membrana absorbente.
- * forma complejos reversibles con el fármaco.
- * se trata de un transporte unidireccional, desde la serosa hacia la mucosa.

* es saturable: cuando todas las moléculas del sistema secretor se hallan unidas a moléculas de fármaco, se llega a la velocidad máxima de secreción.

* presenta especificidad de unión: la molécula secretora reconoce grupos funcionales del fármaco y se une a través de ellos. Con ello se generan fenómeno de competición, es decir, cualquier molécula con igual grupo funcional puede competir con el fármaco por el lugar de unión al sistema secretor. Generalmente, la competición se establece entre fármacos y compuestos con los que el fármaco secretado guarda similitud estructural.

* se produce en contra de gradiente electroquímico y de concentración, por lo que requiere consumo de energía. Cualquier compuesto, como por ejemplo azida sódica, cianuro, ouabaina, que detenga la producción de ATP, provoca una inhibición metabólica de la secreción activa.

Dentro de los sistemas secretores intestinales activos se incluyen: transportadores de aniones y cationes, el sistema MDR (Multi Drug Resistance), dentro del cual tiene especial importancia la glicoproteína P, y el sistema MRP (Multi-drug resistance-associated protein). Tanto el sistema MDR como el MRP, pertenecen al grupo de transportadores ATP-binding cassette (ABC), que son transportadores dependientes de energía (*Higgins C.F., 1992*).

Como se ha comentado anteriormente, en el sistema MDR se incluye la glicoproteína P, proteína que expresa el gen MDR1 (*Bellamy W.T., 1996*). Actualmente, se está profundizando en el conocimiento de su funcionamiento, expresión, secuencia genética, y son numerosos los grupos de investigación que centran sus esfuerzos en este sentido.

En 1970, se demostró que la secreción de algunos glucósidos cardiotónicos y ácidos orgánicos hacia el lumen intestinal se debía a un proceso activo, del que se desconocía su naturaleza. Estudios recientes han puesto de manifiesto la intervención de la glicoproteína P en estos procesos (*Aungst B. J. y col., 1996*).

La primera referencia bibliográfica sobre la glicoproteína P data del año 1979. En este estudio, se logró aislar la glicoproteína P a partir de células mutantes de ovario de hámster chino (CHO), en las cuales la colchicina presentaba una baja permeabilidad (*Riordan J.R. y col., 1979*).

La glicoproteína P posee un peso molecular de 170 Kdaltones (*Debenham P.G. y col., 1982; Piquette-Miller M., 1998*). Se trata de un transportador ATP-dependiente, dependiente también de la temperatura (*Barthe L. y col., 1998*) e independiente del sodio y protones (*Makney V.D. y col., 1998*). Se localiza en la membrana apical de células epiteliales polarizadas (*Thiebaut y col., 1987*). Asimismo, sufre inhibición dependiente de la dosis por competidores específicos (*Spahn-Langguth H. y col., 1998; Doppenschmitt S. y col., 1999*).

La glicoproteína P es codificada por genes que pertenecen al sistema de multiresistencia a fármacos (MDR). Constituyen una familia génica pequeña que en los humanos se subdivide en dos tipos (MDR1 y MDR2) y en los roedores en tres tipos (*mdr1a, mdr1b, mdr2*). Estos genes están asociados a distintas funciones fisiológicas. La glicoproteína P codificada por el gen MDR1 está ligada a la capacidad detoxificadora de la proteína frente a los fármacos, mientras que la codificada por el gen MDR2 parece estar involucrada en el transporte hepático de fosfolípidos (*Smit J.J.M. y col., 1993*).

La glicoproteína P se localiza en células epiteliales intestinales, en hígado, en riñón y en cerebro (*Thiebaut F. y col., 1987*), lo que indica su posible participación en la excreción de toxinas, hormonas y metabolitos fisiológicos, así como en la excreción de fármacos y sus metabolitos, con los que se relacionan estructuralmente. También se ha comentado que se encuentra presente en patógenos humanos como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* y *Candida albicans* (*Van Veen H.W. y Konigs W.N., 1997*).

Una de las causas de la resistencia a fármacos y de los fracasos en la quimioterapia del cáncer, es la sobreexpresión de la glicoproteína P en las células malignas. Algunos estudios demuestran que la expresión de la proteína se produce de manera compleja, aumentando su síntesis en tejidos o células expuestos a xenobióticos, choque térmico o luz ultravioleta (*Hill B.T. y col., 1990; Gant T.W. y col., 1991; Hunter J. y col., 1993*). Entre los fármacos anticancerosos que ven alterada su absorción por intervención de la glicoproteína se encuentran el etopósido, la vinblastina y la vincristina (*Makhey V.D. y col., 1998*).

La glicoproteína P también está involucrada en la secreción activa de glucósidos cardiotónicos como la digoxina (Su S.F. y col., 1996), péptidos (Aungst B.J. y col., 1996), cationes orgánicos como el verapamilo, la clorpromazina y la propantelina (Saitoh H. y col., 1995), un numeroso grupo de β -bloqueantes como nadolol, celiprolol, timolol, acebutolol y talinolol (Terao T. y col., 1996; Spahn- Langguth H. y col., 1998) y, por ello, podría ser la causa, al menos en parte, de la baja biodisponibilidad oral de estos fármacos.

En general se ha visto que la mayoría de los sustratos de la glicoproteína P son moléculas hidrofóbicas que contienen un átomo de nitrógeno básico y dos anillos aromáticos planares (Zamora J.M. y col., 1998). El peso molecular de los sustratos de la glicoproteína P se encuentra entre 300 y 2000 daltons. (Ueda K. y col., 1997).

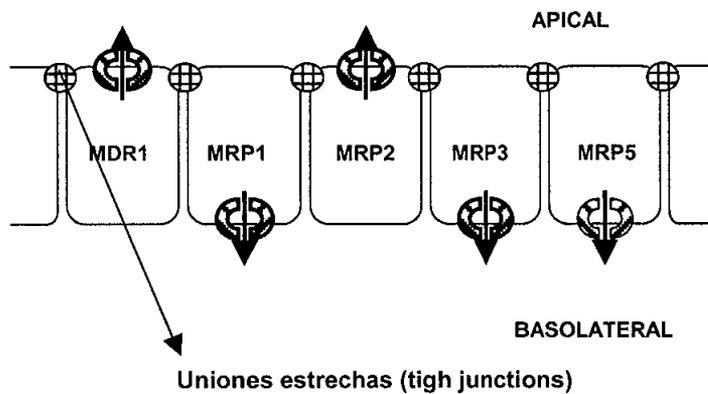
Otro sistema relacionado con la secreción de fármacos es el MRP. La familia MRP contiene al menos seis miembros: MRP1-6. En el año 1992, Cole S. y Deeley R. clonaron el gen que codifica a la proteína del sistema MRP1 (Cole S.P.C. y col., 1992). El MRP2 se descubrió en 1996 (Taniguchi K. y col., 1996) y fue Kool quien en 1997 introdujo el concepto de una familia MRP con cinco miembros (Kool M. y col., 1997). El MRP6 se incluyó en el grupo en 1998 (Kool M., y col., 1999). Pueden aparecer en la bibliografía reseñados con otras siglas: así el MRP1 aparece como ABCC1; el MRP2 como ABCC2, cMOAT o cMRP; el MRP3 como ABCC3 o MOTA-D; el MRP4 también se conoce como ABCC4 o MOTA-B; el MRP5 como ABCC5 o MOTA-C y por último, el MRP6 se conoce como ABCC6 o MLP-1.

Los sistemas MRP1, -2, -3 y -5 son capaces de transportar conjugados de glutatión como el dinitrofenilglutatión (DNP-GS). Además, el MRP1 y el -3 secretan el metotrexato (Masuda M. y col., 1997).

Los sistemas MRP1, -4 y -5 se encuentran ampliamente distribuidos en el cuerpo humano, mientras que el MRP2, -3 y -6 aparecen principalmente en el hígado, los riñones e intestino (Kool M. y col., 1997; Lee K. y col., 1998; Kool M. y col., 1999; König J. y col., 1999).

En cuanto a su localización celular, se ha podido observar, utilizando monocapas polarizadas de células renales, que el MRP1, el -3 y el -5 se disponene en la membrana basolateral, mientras que el MRP2 se sitúa en la membrana apical. Estas posiciones se han corroborado mediante análisis con anticuerpos monoclonales (*Flens M. J. y col., 1996; Schaub T.P. y col., 1997; König J. y col., 1999*).

La localización de estos transportadores se esquematiza en el siguiente dibujo:



La localización de la glicoproteína P y del sistema MRP2 se corresponde con la función secretora de fármacos citotóxicos, pero la disposición basolateral del resto de los sistemas secretores crea muchas incógnitas acerca de su significado fisiológico.

Algunos autores sugieren que, por ejemplo, el sistema MRP1 protege a las células de su destrucción, como sucede en el caso de la membrana basal de la mucosa oral, o también, en las células de los túbulos seminíferos (*Wijnholds J. y col., 1998*). En este último caso, las células germinales masculinas están protegidas por un anillo de células denominadas de Sertoli. Estas células son alargadas y se extienden desde la membrana basal, a través del epitelio espermatogénico, hasta la luz de los túbulos seminíferos espermatogénicos. Entre sus fun-

ciones destaca la de actuar como barrera hematotesticular, ya que impide el acceso de sustancias nocivas contenidas en la sangre al tejido espermatogénico (Lippert H., 2000). La presencia del MRP1 en la membrana basal de las células de Sertoli protege a las células germinales de los fármacos, ya que los expulsan fuera de los túbulos seminíferos.

En el plexo coroideo, el sistema MRP1 también actúa como una barrera protectora, modulando el acceso al líquido cerebroespinal y controlando el intercambio de metabolitos entre la sangre y el líquido cerebroespinal. Las células epiteliales del plexo coroideo contienen una cierta cantidad de MRP1 (Rao V.V. y col., 1999) y recientemente se ha demostrado que la ausencia de este transportador se acompaña de una acumulación de etopósido en el líquido cerebroespinal tras su administración intravenosa (Borst P. y col., 1999).

Hasta el momento, los estudios sobre secreción intestinal de fármacos a cargo de la glicoproteína P, se han desarrollado en dos vertientes: estudios *in vivo*, utilizando animales de experimentación, como ratas y conejos principalmente, y estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares transformadas que sobreexpresan la glicoproteína P en su membrana. Una de las líneas celulares más utilizadas es la de Caco-2 (células de cáncer de colon humano), para las cuales la metodología de trabajo está bien establecida (Artursson P., 1990; Kuo S.M. y col., 1994; Ranaldi G. y col., 1994; Ferruzza S. y col., 1995).

Estos estudios acostumbran a seguir una línea de trabajo común: para establecer si un determinado fármaco es sustrato de la glicoproteína P, se elige un inhibidor específico que, administrado junto con el fármaco, compita con éste por la unión a la glicoproteína. En la actualidad, no existe homogeneidad de criterios en cuanto a si existe uno (Doppenschmitt S. y col., 1998) o varios lugares de unión al sustrato (Doppenschmitt S. y col., 1999). Lo que sí resulta evidente es que se trata de una inhibición competitiva por el lugar de unión.

1.3.1 Determinación de sistemas secretores mediante el uso de cultivos celulares

El intestino delgado constituye el lugar fundamental para la absorción de nutrientes y no nutrientes ingeridos con la dieta o con fines terapéuticos. Desde un punto de vista toxicológico, el intestino puede considerarse como un órgano diana, ya que se encuentra expuesto directamente a la acción de las sustancias ingeridas.

La absorción intestinal de cualquier xenobiótico depende, por una parte, de sus características físico-químicas y, por otra, de las características químicas (composición protéica y lipídica) y dinámicas (actividades enzimáticas, presencia de sistemas de transporte, etc.) de la membrana absorbente. Para evaluar las características de absorción y posible toxicidad de una sustancia resulta interesante el uso de métodos *in vitro* con líneas celulares, capaces de mantener las características de absorción, transporte y actividad metabólica a un nivel análogo al que presentan las células intestinales *in vivo*.

Tradicionalmente, los estudios de absorción y toxicidad de xenobióticos se han realizado con animales enteros, o bien con tejido intestinal aislado y mantenido en cultivo durante un breve periodo de tiempo. Estas técnicas son, sin embargo, laboriosas, costosas y comportan la utilización de un gran número de animales. Asimismo, el aislamiento de células a partir del tejido conlleva una inevitable pérdida de la estructura polarizada que confiere, al epitelio intestinal, su función de barrera selectiva (Rodríguez-Boulan R., 1989).

En los últimos años se ha trabajado en la puesta a punto de modelos celulares homogéneos, reproducibles y, sobre todo, fáciles de manipular que, a su vez, mantengan las características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros. Las líneas celulares procedentes de células tumorales humanas se presentan como una alternativa a los estudios con animales o con tejido aislado, ya que son capaces de diferenciarse *in vitro* mostrando características morfológicas y funcionales muy similares a las de la mucosa intestinal.

Los cultivos celulares pueden presentar algunas ventajas respecto a los modelos de absorción convencionales. Entre ellas se incluyen:

- 1) la rápida evaluación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos
- 2) la oportunidad de estudiar los mecanismos de absorción de fármacos bajo condiciones controladas
- 3) la rápida evaluación de métodos que mejoren la absorción de fármacos
- 4) la oportunidad de realizar estudios con líneas celulares humanas
- 5) la oportunidad de minimizar el tiempo y la experimentación animal, tan controvertida a veces

Las líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinomas pueden clasificarse en cuatro tipos, según su grado de diferenciación (*Chantret I. y col., 1988*):

TIPO 1: incluye células que se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo. En ellas se observa una polarización de las células con formación de DOMES y un óptimo desarrollo de los bordes en cepillo apicales, con gran cantidad de hidrolasas, como la lactasa, la sucrasa-isomaltasa. Solamente una línea celular pertenece a este grupo, las células Caco-2.

Los domes son microestructuras que se forman cuando las células ya han ocupado todo el espacio del que disponen para dividirse y extenderse por la superficie de crecimiento. En ese momento, al tocarse unas con otras, comienza un proceso de diferenciación que se visualiza microscópicamente mediante la formación de estas estructuras. Los domes se distinguen perfectamente al microscopio porque son estructuras completamente redondas y presentan un brillo más intenso que el fondo celular. Parece ser que su formación está relacionada con los niveles de AMP cíclico de la célula (*Lever J.E., 1979; Dulbecco R. y Okada S.; 1980*).

TIPO 2: son células que no se diferencian espontáneamente. A este tipo pertenecen tres líneas: las HT-29, las HCT-EB y las HCT-GEO. Su diferenciación se puede inducir por alteración de las condiciones de cultivo, como sucede con las HT29 al reemplazar glucosa por galactosa

TIPO 3: son células organizadas en monocapas polarizadas con formación de Domes, pero sin presentar ninguna de las características de la diferenciación enterocítica, por ejemplo, no tienen expresión de hidrolasas en el borde en cepillo. Dentro de este tipo se incluyen ocho líneas celulares entre las que se cita, a modo de ejemplo, las HRT-18 y las SW-1116.

TIPO 4: son células que crecen en MULTICAPAS, sin signos de diferenciación.

Las tres líneas celulares más estudiadas y caracterizadas son las HT29, las Caco-2 y las T84. Todas proceden de adenocarcinomas gastrointestinales humanos (*Neutra M. y Louvard D., 1989*).

De ellas, las Caco-2 constituyen la línea más adecuada para los estudios de absorción y toxicidad de xenobióticos, dada la facilidad para mantenerlas en cultivo, su rápido crecimiento y diferenciación, así como la gran actividad enzimática y de transporte que presentan, comparables a las de los enterocitos del intestino delgado.

Esta línea celular fue aislada en 1974 por Fogh (*Fogh J. y col., 1977*). En cultivo, estas células se diferencian espontáneamente una vez han alcanzado la confluencia, y en el plazo de 17-21 días forman de un monoestrato celular polarizado unido mediante uniones estrechas intercelulares (tight junctions). En la membrana apical presentan microvillis y una estructura similar, en cuanto a forma y constitución protéica, a la que tienen las células columnares del intestino delgado (*Pinto M. y col., 1983; Hidalgo I.J. y col., 1989; Wilson G. y col., 1990*). Durante la fase diferenciativa, las células expresan progresivamente distintas actividades hidrolásicas, como la sacarasa-isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa, dipeptidilpeptidasa IV y fosfatasa alcalina, típicas de los enterocitos del intestino delgado (*Pinto M. y col., 1983; Grasset E. y col., 1985; Zweibaum A., 1991*).

Los valores de permeabilidad aparente obtenidos en los estudios de transporte con células Caco-2, han puesto de manifiesto una buena correlación entre ellos y los obtenidos en estudios de absorción intestinal, en humanos (*Artursson P. y col., 1991; Stewart B.H. y col., 1995*). Por ello, estas células se utilizan tanto para conocer los mecanismos que rigen la absorción de los fármacos, como para el desarrollo de ensayos preclínicos destinados a la selección de fármacos (screening) (*Artursson P. y col., 1996; Delie F. y col., 1997*).

Una de las principales limitaciones al uso de Caco-2 es su largo periodo de crecimiento y diferenciación (alrededor de 3 semanas), lo que aumenta los costes de mantenimiento. Es por ello que surge como alternativa la línea celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Estas células a pesar de su origen renal, presentan las mismas ventajas que las Caco-2 pero, tienen un periodo de diferenciación mucho más corto.

Las células MDCK constituyen un modelo alternativo para el estudio del transporte de fármacos y, al igual que las Caco-2, alcanzan una diferenciación similar a las células columnares epiteliales, pero en un periodo de 5 a 10 días (*Horio M. y col., 1989*).

La utilización de esta línea celular fue propuesta por Cho y colaboradores en 1989 (*Cho M. y col., 1989; Cho y col., 1990*). Ranaldi y colaboradores compararon valores de permeabilidad efectiva de distintos compuestos antimicrobianos obtenidos en células MDCK y Caco-2 y concluyeron que las células MDCK constituían un buen modelo para comparar con las Caco-2 (*Ranaldi G., y col., 1996*).

Puesto que estas células expresan la glicoproteína P en su membrana apical (*Horio M. y col., 1989*), se utilizan también, en los estudios de secreción de fármacos. Asimismo, poseen propiedades de las células distales de los túbulos renales, por ello, también se utilizan para estudiar el transporte de fármacos a través de las células tubulares renales .

1.3.1.1 Ensayos con líneas celulares

En general, las líneas celulares se cultivan en soportes permeables (filtros de policarbonato) donde es posible obtener un sistema de dos compartimentos separados por el monoestrato celular. Este sistema reproduce la situación estérica de la mucosa intestinal *in vivo* y favorece la organización polarizada de las células epiteliales. El soporte, al ser permeable, permite el paso de nutrientes y demás sustancias entre ambos compartimentos. El compartimento APICAL reproduce la cara luminal intestinal y el BASOLATERAL el espacio que, *in vivo*, contacta con el espacio intersticial y con el sistema vascular (**Figura 2.2**). La metodología de trabajo con estas células se explica más detalladamente en el *Capítulo 2*.

1.3.2 Determinación biomolecular de sistemas secretores: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR, (acrónimo del inglés de Polymerase Chain Reaction) es un método rápido y sencillo que permite la amplificación *in vitro* de secuencias de DNA. Su fundamento se basa en aquel que utiliza la célula *in vivo*. Para ello, se utiliza una DNA polimerasa.

Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación **selectiva** de una o varias secuencias diana (secuencia que se quiere amplificar) presentes en una mezcla compleja de secuencias. Para que la amplificación selectiva sea posible, es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia diana. Esta información permite el diseño de dos oligonucleótidos, habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, que actúan como **cebadores** o iniciadores, en inglés *primers*, de la reacción.

Para realizar una PCR, además del DNA molde y los cebadores, deben estar presentes una DNA polimerasa termoestable, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), un tampón adecuado y sales.

La base teórica de la reacción de la PCR se concreta en tres pasos fundamentales:

1º) Desnaturalización: El DNA de doble cadena que se quiere amplificar se desnaturaliza por calor (93-95°C) hasta su disociación.

2º) Hibridación de los cebadores: Los cebadores hibridan con el DNA de cadena sencilla. Los cebadores se añaden en exceso respecto al DNA molde y se escogen condiciones de hibridación que permitan la unión del cebador sólo a sitios altamente homólogos del molde.

3º) Síntesis de DNA: Se produce la extensión de los cebadores por la DNA polimerasa; cada uno lo hace en dirección 5'-3', utilizando como molde el DNA de cadena sencilla al que está unido. Esta parte de la reacción se produce a 70-75°C.

Quando los oligonucleótidos cebadores se mezclan con DNA desnaturalizado, se unen específicamente a las secuencias de las que son complementarias, que se sitúan inmediatamente adyacentes a la región de la secuencia que se quiere amplificar.

Habitualmente se utiliza la *Taq polimerasa*, que es una DNA polimerasa termoresistente. Se obtiene a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es estable hasta 94°C y su temperatura de trabajo óptima es de 80°C.

La PCR es un proceso cíclico. La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización, la hibridación y la extensión de la síntesis por acción de la polimerasa, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos de DNA.

Al producirse la desnaturalización del DNA se generan dos cadenas de DNA sencillas que sirven de molde para la síntesis. Como se ha indicado, los cebadores se unen a las regiones de las que son complementarios y que delimitan la secuencia que se quiere amplificar.

La DNA polimerasa se une al extremo 3'OH libre del cebador y comienza la síntesis de la hebra complementaria en dirección 5'-3'. Estas dos hebras nuevas de DNA poseen su extremo 5' fijo, delimitado por la posición de los cebadores, mientras que sus extremos 3' poseen una longitud variable porque no tienen una señal común de parada. En los ciclos posteriores las hebras de nueva síntesis actúan a su vez como molde para la síntesis de hebras complementarias del

tamaño deseado (los extremos 5' quedan definidos por el cebador y los extremos 3' quedan fijos ya que la síntesis no puede ir más allá del extremo reconocido por el otro cebador).

El producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de DNA de doble cadena cuyo final está definido por los extremos 5' de cada uno de los cebadores y cuya longitud está definida por la distancia entre ellos. Además, durante la reacción se generan moléculas de mayor longitud. Los productos de un primer ciclo de amplificación son moléculas de DNA formadas heterogéneamente y de longitudes indeterminadas que pueden exceder la distancia entre los sitios de unión de los cebadores, pero en el segundo ciclo de replicación estas moléculas generan DNA de longitud definida que se acumulará de manera exponencial en posteriores rondas de replicación y formará los productos dominantes de la reacción. Aunque se siguen formando moléculas más largas a partir de los DNAs molde originales en cada ronda, solo se acumulan en tasa lineal y no contribuyen significativamente al conjunto final de secuencias amplificadas.

En la **Figura 1.2** se muestra el proceso completo.

De esta manera, después de 30 ciclos de PCR se obtiene una amplificación aproximada de un millón de veces. Esta cantidad puede ser detectada fácilmente como una banda discreta, de tamaño específico, al realizar una electroforesis en gel.

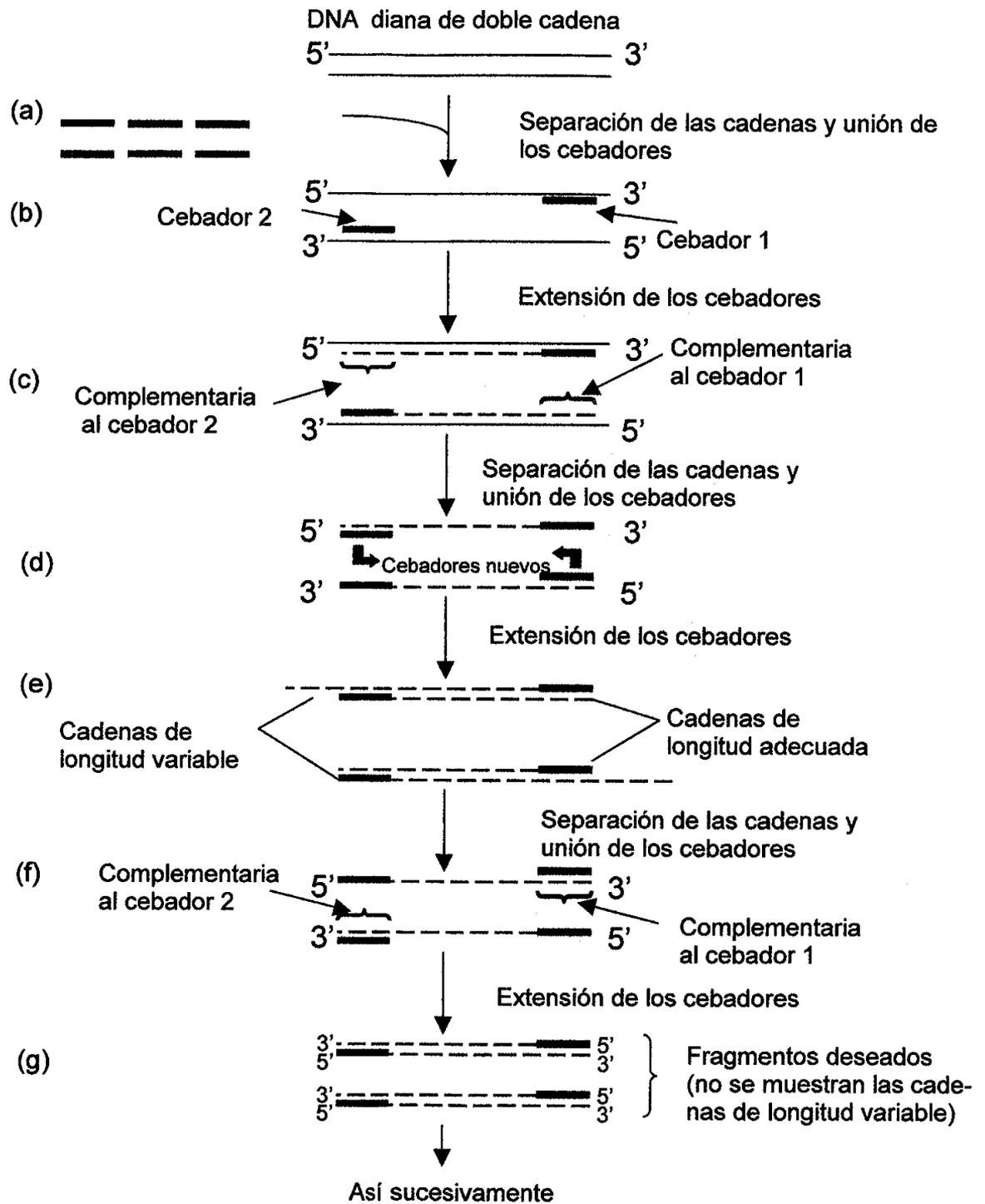


Figura 1.2: (a) DNA de doble cadena que contiene la secuencia que queremos amplificar. (b) Se eligen o crean dos cebadores cuyas secuencias complementan con los extremos 3' de una u otra de las cadenas del gen diana. Las dos cadenas se separan por calor, permitiendo que los dos cebadores se unan a sus secuencias complementarias. De esta forma, los cebadores flanquean la secuencia blanco. (c) La polimerasa *Taq* sintetiza las primeras cadenas complementarias de la reacción. Estas dos cadenas nuevas tienen longitudes variables porque no tienen una señal común de parada. Se extienden más allá de los extremos de la secuencia diana delimitada por los sitios de unión de los cebadores. (d) Las dos moléculas de cadena doble se calientan de nuevo para que expongan sus cuatro sitios de unión a los cebadores. (Para simplificar se muestran sólo las dos cadenas nuevas). Los dos cebadores se unen nuevamente a sus cadenas respectivas en los extremos 3' de la región diana. (e) La polimerasa *Taq* sintetiza de nuevo dos cadenas complementarias. A pesar de que las cadenas molde tienen longitudes variables en esta etapa, las dos cadenas sintetizadas a partir de ellas tienen la longitud precisa de la secuencia diana. Esto se debe a que cada cadena nueva empieza en el sitio de unión del cebador, en un extremo de la secuencia diana, y continúa hasta que acaba el molde, en el otro extremo de la secuencia. (f) Ahora cada cadena nueva comienza en una secuencia del cebador y termina en la secuencia de unión al otro cebador. Tras la separación de las cadenas, los cebadores se aparean nuevamente, extendiéndose las cadenas hasta la longitud de la secuencia diana. (Las cadenas de longitud variable de la parte (c) están produciendo también cadenas de la longitud de la secuencia diana). (g) El proceso puede repetirse indefinidamente, creando cada vez dos moléculas de DNA de cadena doble idénticas a la secuencia diana (*Tomado de J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, "Recombinant DNA", 2º ed. Copyright 1992 de Scientific American Books*).

Diseño de cebadores

La especificidad de la amplificación depende necesariamente de la especificidad en el reconocimiento de la secuencia diana respecto de otras presentes en la muestra por parte de los oligonucleótidos cebadores.

Para muestras complejas a menudo basta con diseñar dos cebadores que tengan unos 20 nucleótidos. En estas condiciones se reduce la probabilidad de que estos cebadores tengan una correspondencia perfecta con otras secuencias que no sean la buscada.

Sin embargo, a veces se producen amplificaciones erróneas. Esto puede suceder si uno o ambos cebadores contienen parte de una secuencia repetitiva. Por ello, en el diseño de los cebadores se tienen en cuenta las secuencias repetitivas conocidas, y también se debe tener la precaución de evitar largas tiras de un mismo nucleótido. También debe evitarse que las dos bases de los extremos 3' de los cebadores sean complementarias entre sí. De lo contrario podrían producir dímeros de cebadores que reducirían la eficiencia de la amplificación.

El diseño y la síntesis de los oligonucleótidos cebadores requiere su tiempo. Actualmente, el diseño de los cebadores se realiza mediante programas informáticos y la síntesis de los mismos la llevan a cabo casas comerciales especializadas.

Nucleótidos trifosfato.

Se requieren de gran pureza.

La concentración de los dNTPs utilizada en las reacciones de PCR oscilan entre 100-200 μM para cada dNTP. Si la concentración es mayor de 200 μM aumenta el error de la DNA polimerasa, llegando incluso a inhibirla. Los dNTPs quelan magnesio y cambian su concentración óptima efectiva.

La concentración óptima de dNTPs depende de la concentración de MgCl_2 , de la concentración de cebadores, de la longitud del producto amplificado y del número de ciclos de PCR.

Tampón

El tampón estándar para la reacción de la PCR tiene la siguiente composición:

Tampón de amplificación 5X (debe ser diluído 1:5 v/v, antes de usarse)

*75 mM Tris-HCl pH 9.0

*50 mM KCl

*2 mM MgCl₂

*20 mM (NH₄)₂SO₄

*0.001% BSA

Por último debe indicarse que la PCR es una técnica ampliamente utilizada debido a las características que posee, que se resumen a continuación y que representan una ventaja frente a otros métodos:

- **Rapidez y sencillez:** permite clonar DNA en pocas horas. Una PCR normalmente consta de 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura entre 3-5 minutos. En cambio, la clonación en células suele necesitar semanas o incluso meses.
- **Sensibilidad de la reacción:** puede amplificar secuencias de DNA a partir de cantidades ínfimas de DNA diana, incluso a partir del DNA contenido en una sola célula.
- **Robustez del método:** permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene DNA muy degradado, o incluido en un medio de difícil purificación.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 COMPUESTOS ENSAYADOS

2.1.1 Fármaco

El fármaco ensayado ha sido el salbutamol sulfato, cedido por el laboratorio Aldo-Unión, S.A. A partir de este producto se han preparado las soluciones que se han empleado en la elaboración de la presente Memoria.

El polvo se ha conservado en un recipiente de cristal topacio protegido de la luz.

2.1.2 Sustancias inhibidoras

Para determinar la existencia de un proceso de secreción activa del fármaco hacia el lumen intestinal, mediado por la glicoproteína P o por cualquier otro sistema de secreción, se han utilizado tres inhibidores de distinta naturaleza y mecanismo de acción:

a) Un inhibidor específico del sistema MDR1 (glicoproteína P): el verapamilo (*Gatmaitan Z.C. y col., 1993*). En concreto se ha utilizado hidroclorehidrato de verapamilo, suministrado por la empresa Sigma-Aldrich Chemie, con una pureza aproximada del 99.0%. Su fórmula molecular es $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ y su peso molecular es 491.1.

b) Un inhibidor metabólico: la azida sódica, Na_3N . Este compuesto actúa inhibiendo todos los procesos dependientes del ATP. La azida sódica por la marca tiene un peso molecular de 46.01 y se ha utilizado a una riqueza del 99,0%.

c) Un componente de la dieta: el zumo natural de pomelo (*Citrus aurantium*). Parece ser que algunas sustancias, todavía por determinar, que se encuentran en el zumo de pomelo, son capaces de modular la actividad secretora de la glicoproteína P intestinal y/o del citocromo P450 3A4 (*Takanaga H. y col., 1998; Eagling V.A. y col., 1999*).

2.2. ENSAYOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL *IN SITU*

2.2.1 Animales de experimentación

Para los ensayos de absorción se han utilizado ratas albinas macho de raza Wistar de 2 a 3 meses de edad, procedentes del estabulario de nuestra Facultad y mantenidas con una dieta estándar. Se han controlado las condiciones del estabulario en cuanto a higiene, climatización y ciclos de luz, de modo que sean óptimas.

Los animales se han mantenido en ayunas durante las 20 horas previas al ensayo de absorción, en una jaula de doble fondo para evitar la coprofagia y sin limitaciones en cuanto al agua de bebida. Tras el ayuno, el peso de las ratas utilizadas ha oscilado entre 200 y 300 gramos.

2.2.2 Soluciones de trabajo

En este apartado se describen las distintas soluciones utilizadas en los ensayos de absorción del salbutamol.

2.2.2.1 Solución anestésica

La anestesia de las ratas se ha inducido con una solución de uretano (etilcarbamato) al 25% (m/V) en agua destilada, administrada por vía intraperitoneal a la dosis de 0.4 mL por cada 100 gramos de peso corporal. Para la perfecta disolución del uretano es aconsejable calentar ligeramente el agua durante la preparación de la solución anestésica. Asimismo, es conveniente renovar semanalmente esta solución y conservarla en el frigorífico a 4°C, dada su poca estabilidad.

2.2.2.2 Líquidos de lavado intestinal

Se utilizan para limpiar el lumen intestinal, con el fin de arrastrar los residuos que puedan quedar en él tras el periodo de ayuno. También sirven para regular el pH del lumen intestinal de manera que la absorción no se vea afectada por una alteración del pH fisiológico de la zona.

2.2.2.2.1 Solución "A" de lavado

Tiene por objeto eliminar los restos de materia que puedan quedar en el intestino después del periodo de ayuno. Su composición cuantitativa es la siguiente:

Cloruro sódico.....	8.48 g
Cloruro potásico.....	0.34 g
Cloruro cálcico	0.14 g
Fosfato monopotásico.....	0.60 g
Agua bidestilada c.s.p.....	1000 mL

El peso de las sales indicadas se refiere a sustancia anhidra.

2.2.2.2.2 Solución "B" de lavado

Es una solución de suero fisiológico que lleva incorporado un 10 % de solución reguladora de fosfatos de tipo Sørensen, ajustada al pH fisiológico de la zona. La composición cuantitativa de esta solución "B" es la siguiente:

Cloruro sódico.....	9 g
Tampón fosfatos según Sørensen.....	10 mL
Agua bidestilada c.s.p.....	1000 mL

La composición del tampón fosfato se modifica en virtud del tramo intestinal seleccionado ya que los valores de pH *in vivo* son diferentes en cada tramo. Se ha utilizado un valor pH de 6.4 cuando se realizaron los ensayos de perfusión en el intestino delgado completo, 6.5 para el tramo proximal, de 6.7 para el tramo medio y colon y, finalmente, un valor de 6.9 para el tramo distal

La composición de la solución reguladora de fosfatos según Sørensen tiene la siguiente composición, para 10 mL:

Tampón fosfato de pH 6.4

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 1/15 M	7.54 mL
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O 1/15 M	2.46 mL

Tampón fosfato de pH 6.5

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 1/15 M	6.53 mL
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O 1/15 M	3.47 mL

Tampón fosfato de pH 6.7

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 1/15 M	5.34 mL
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O 1/15 M	4.66 mL

Tampón fosfato de pH 6.9

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 1/15 M	3.90 mL
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O 1/15 M	6.10 mL

Una vez preparada la solución de lavado "B", se comprueba el pH final obtenido. En caso de necesidad, se adiciona NaOH 0.1N o HCl 0.1N hasta obtener el pH deseado.

A su vez, las soluciones reguladoras se preparan como se indica:

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1/15 M
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	1/15 M

Los líquidos de lavado se conservaron en frigorífico, renovándolos cada semana.

2.2.2.3 Soluciones de perfusión

2.2.2.3.1 En intestino delgado completo

Para proceder al estudio del mecanismo de absorción intestinal del salbutamol, se han perfundido siete soluciones isotónicas del fármaco. Las concentraciones seleccionadas han sido: 0.15, 0.29, 1.20, 5.00, 9.00, 13.00 y 18.00 mM.

Con el fin de detectar la existencia de un posible fenómeno de secreción activa del fármaco al lumen intestinal, los ensayos de inhibición se han iniciado empleando un inhibidor específico de la glicoproteína P, el verapamilo. Se han perfundido soluciones mixtas de salbutamol, a la concentración de 0.29 mM (equivalente a la dosis alométrica en humanos), y verapamilo a las concentraciones diferentes 10 y 20 mM.

Asimismo, se ha ensayado un inhibidor metabólico, la azida sódica. Se han perfundido soluciones mixtas de azida sódica y salbutamol en el intestino delgado completo de la rata. La concentración de salbutamol (0.29 mM) se ha mantenido constante y se ha adicionado la azida sódica en concentraciones crecientes: 0.3, 3 y 6 mM.

Por último, se ha utilizado zumo natural de pomelo en presencia de salbutamol 0.29 mM. El zumo se ha adicionado en proporción volumétrica 50/50, es decir, la mitad de zumo de pomelo y la mitad de agua destilada.

Todas estas soluciones se han preparado de igual modo, con las cantidades correspondientes de cada uno de los fármacos, adicionadas de un 10% de solución reguladora de fosfatos y, cuando fue necesario, modificando la cantidad de cloruro sódico para que resultaran isotónicas con la sangre.

Como control de la integridad de la membrana y del flujo sanguíneo durante los ensayos de inhibición con el verapamilo, se ha utilizado la antipirina. Este fármaco se absorbe únicamente por difusión pasiva. Se ha perfundido en solución libre a la concentración 1.33 mM y en presencia de verapamilo, 10 y 20 mM, respectivamente. Esta precaución ha sido necesaria puesto que el verapamilo es un fármaco vasodilatador que podría aumentar el flujo sanguíneo de la

zona intestinal durante los ensayos de absorción o el espacio intercelular propio de los enterocitos. En consecuencia, la pseudoconstante de absorción del salbutamol podría falsearse en exceso. Para determinar la influencia del verapamilo sobre la integridad de la membrana absorbente y/o el riego sanguíneo, se ha determinado la constante aparente de absorción de la antipirina en solución libre y en presencia del inhibidor.

2.2.2.3.2 En tramos intestinales

Para los ensayos realizados en los distintos tramos intestinales (proximal, medio, distal y colon), se ha utilizado, únicamente, la concentración de salbutamol 0.29 mM. En los tramos proximal y distal se han perfundido, también, soluciones mixtas de salbutamol 0.29 mM y verapamilo a concentración 10 mM.

Las soluciones, normalmente, se prepararon en el momento de su utilización.

En algunos casos se prepararon el día anterior y se mantuvieron en el frigorífico a una temperatura comprendida entre -4°C y 0°C hasta el momento de usarlas.

2.2.3 Osmolaridad

Las soluciones de perfusión ensayadas deben ser isotónicas con la sangre; si no es así, las concentraciones remanentes de salbutamol en el lumen intestinal estarán falseadas por exceso o por defecto, debido a los intercambios de agua que se producen para reestablecer el equilibrio osmótico a ambos lados de la membrana absorbente intestinal. Este efecto, si no se corrige, determina que las constantes aparentes de velocidad de absorción del fármaco calculadas se hallen, a su vez, falseadas (*Foradada A. y col., 1974*).

La osmolaridad de las disoluciones se ha medido con un osmómetro automático OSMOMAT OM-6020, por el método de descenso crioscópico.

Todas las soluciones de perfusión ensayadas presentaron una osmolaridad que osciló entre 291 y 298 mOsm/L.

2.2.4 Técnica quirúrgica

Para la determinación de la constante aparente de velocidad de absorción intestinal del salbutamol, se ha utilizado una técnica de perfusión *in situ* adaptada a nuestras condiciones experimentales (Doluisio J.T. y col., 1969; Martín Villodre A. y col., 1986).

Los animales de experimentación se mantienen en ayunas durante las 20 horas previas al ensayo de absorción con acceso libre al agua de bebida.

Una vez concluido el periodo de ayuno, se procede a la anestesia del animal. Para ello, se introduce la rata en una campana de gases saturada de vapores de éter etílico. Se realiza una anestesia ligera que permite pesar al animal con comodidad. Una vez recuperado el reflejo de enderezamiento, se procede a la inyección intraperitoneal de la solución anestésica.

A continuación, se deja la rata en reposo durante unos 45 minutos para que alcance la anestesia profunda, lo que se comprueba por la desaparición del reflejo palpebral. Durante este tiempo, es conveniente mantener al animal a una temperatura aproximada de 37°C para evitar que se enfríe, lo que modificaría el flujo sanguíneo y, con ello, la velocidad de absorción.

Una vez el animal alcanza la anestesia profunda, se coloca en posición de decúbito supino sobre un tablero quirúrgico y se sujeta por las extremidades, con cinta adhesiva, sin forzar su posición natural.

Con ayuda de unas pinzas en "diente de ratón" y unas tijeras de punta roma, se procede a realizar una incisión longitudinal en la piel, desde 1 cm por encima del poro genital hasta 1 cm por debajo del apéndice xifoides, evitando lesionar los músculos abdominales. Para poner al descubierto el paquete abdominal se separan los rectos abdominales, cortando a lo largo de la línea alba, por lo que la hemorragia resulta mínima.

Una vez descubierta la cavidad abdominal, se selecciona la zona intestinal que va a ser objeto del ensayo de absorción:

Intestino delgado completo

En primer lugar se localiza la zona proximal de éste que, por analogía con la especie humana, denominaremos duodeno. Puesto que en este tramo desemboca el colédoco, conducto que transporta la bilis desde el hígado, se liga este último con un hilo de seda para evitar la posible aparición de un ciclo enterohepático, que falsearía la cinética de la absorción en caso de que el medicamento se excretara por la bilis.

A continuación se practica un pequeño corte en bisel en la zona proximal del duodeno, en el que se introducen unas pinzas de punta fina para aumentar la abertura y facilitar la introducción de una cánula de vidrio acodada. La cánula se sujeta ligándola firmemente al intestino mediante un hilo de seda que se introduce con ayuda de unas pinzas de punta fina, entre el duodeno y la vena mesentérica superior, con cuidado de no dañar esta vena ni los capilares cercanos, ya que de lo contrario se altera el riego sanguíneo de la zona y, por consiguiente, la velocidad de absorción del fármaco.

La cánula de vidrio se une, mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo "Stopcock" y ésta, a su vez, se conecta a una jeringa "Multifit" de 10 mL de capacidad, que se sujeta con una pinza a un soporte vertical. Se debe procurar que la posición de la cánula respete al máximo la disposición natural del intestino y permita extraer las muestras intestinales sin dificultad.

La llave de tres pasos permite realizar las siguientes conexiones:

* jeringa-intestino: facilita la introducción y vaciado del líquido en el intestino así como el bombeo de aire al interior del mismo.

* jeringa-exterior: permite llenar la jeringa de aire para su posterior introducción en el intestino con objeto de eliminar al máximo los restos de líquido de lavado. En esta posición se consigue que el tramo se convierta en un compartimento estanco.

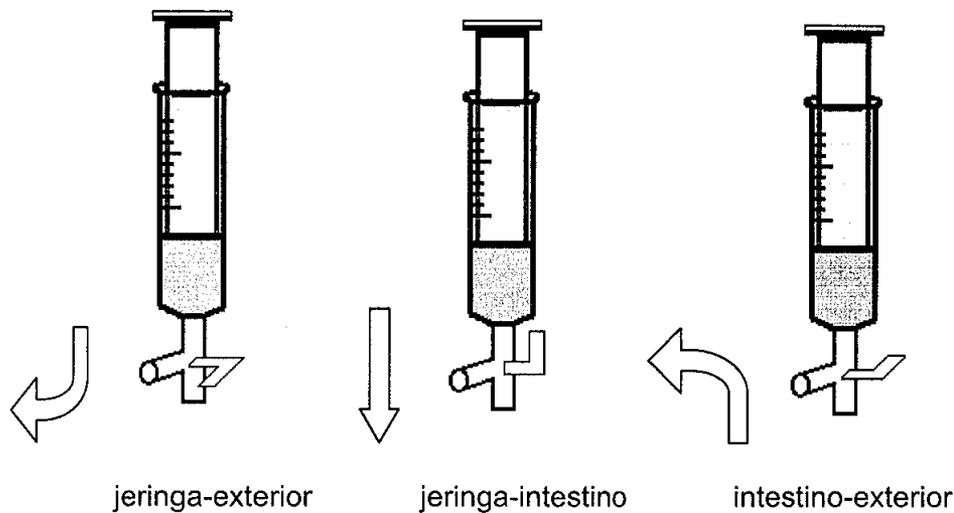
* intestino-exterior: la llave, así dispuesta, permite evacuar el aire del interior del intestino evitando, de este modo, su excesiva distensión.

A continuación, se procede a localizar el extremo final del intestino delgado y, al igual que en el caso anterior, se practica un corte oblicuo cerca de su intersección con el ciego.

Puesto que el lumen intestinal debe quedar libre de cualquier resto de materia, se procede a limpiar el intestino delgado con ayuda de la cánula y la jeringa proximal haciendo pasar la solución de lavado "A" calentada a 37°C. Para ello, se introducen en la jeringa proximal unos 10 mL de líquido de lavado, se coloca la llave de tres pasos en la posición jeringa-intestino y, presionando ligeramente con el émbolo, se hace pasar lentamente el líquido por el intestino hasta que sale por el orificio cercano al ciego, arrastrando con él los detritus. Este paso se repite varias veces hasta que el líquido de lavado se recupera limpio. Posteriormente, se repite la misma operación con solución de lavado "B" a pH 6.4 al menos tres veces.

En la operación de lavado no se debe ejercer una presión excesiva con el émbolo con objeto de evitar lesiones en la mucosa intestinal que, en caso de producirse, podrían alterar la perfusión sanguínea y, por consiguiente, falsearían la determinación de la constante de velocidad de absorción.

Una vez arrastrados los residuos y acondicionada la mucosa, se procede a implantar una cánula en la zona distal del intestino, de las mismas características que la implantada en la zona proximal. Una vez situadas las dos cánulas, se realiza un último lavado para eliminar cualquier resto de suciedad o de mucosa.



Finalizado el proceso de lavado, se conecta la cánula distal a una llave de tres pasos y ésta, a su vez, a una jeringa que se sujeta a un soporte vertical, procurando que se mantenga la posición natural del intestino.

Por último, se bombea aire a través del intestino, de una jeringa a otra y de forma alternativa, para eliminar completamente el líquido residual procedente del lavado. De este modo, se evita una dilución excesiva de la solución de perfusión, lo que provocaría una disminución significativa del valor de la ordenada en origen en la recta representativa de la cinética de absorción.

Con el fin de evitar la pérdida de agua a partir de la cavidad abdominal, se introduce en la misma un pequeño volumen de líquido de lavado, a 37 °C y, a continuación, se cubre la incisión con una torunda de algodón empapada con el mismo. Ésta debe renovarse con frecuencia durante el ensayo, con objeto de evitar que se enfríe la cavidad abdominal y disminuya el riego mesentérico.

Finalizado el acondicionamiento, la zona de intestino seleccionada forma un compartimento aislado, preparado para proceder a la perfusión de la solución de fármaco a ensayar.

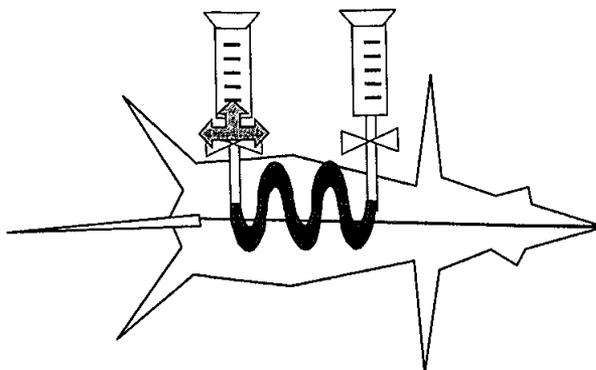


Figura 2.1. Montaje experimental

Tramos intestinales

La longitud media del intestino delgado de la rata adulta es de un metro aproximadamente (Sánchez Picó A. y col., 1984), de manera que se puede fraccionar en tres tramos (proximal, medio, distal), de aproximadamente 33 cm cada uno, con el fin de obtener tres sectores intestinales asimilables a duodeno, yeyuno e íleon.

En este caso, se procede de la misma forma que en los estudios de absorción en intestino delgado completo, previa selección del tramo objeto de ensayo. Las medidas se realizan con un hilo de seda de 33 cm, distendiendo ligeramente el intestino.

Cuando se realizan los ensayos en los tramos medio, distal o colon, no es necesario ligar el colédoco.

Colon

El colon se canula desde su salida del ciego hasta la altura del colon sigmoideo. La preparación de esta zona es idéntica a la descrita previamente.

Sin embargo, y puesto que en el colon existen heces formadas, los primeros lavados se realizan haciendo pasar líquido de lavado a pH 6.7, desde la parte inicial del colon y recuperándolo con una placa de fondo plano situada debajo del

ano del animal. Una vez arrastradas las heces firmes, se procede a la canulación de la porción terminal del colon y se completa el montaje tal y como se ha descrito con anterioridad.

2.2.5 Ensayo de absorción

Si el ensayo de absorción se realiza en intestino delgado completo, se colocan las llaves en posición intestino-exterior y se introducen 10 mL de la solución de perfusión en la jeringa proximal. Cuando los ensayos de absorción se realizan en tramos intestinales o en colon, se perfunden 5 mL de la solución a ensayar. Seguidamente, se coloca la llave en posición jeringa-intestino y, presionando ligeramente con el émbolo, se introduce en el intestino la totalidad del líquido. La llave distal se mantiene en posición jeringa-exterior para facilitar el desplazamiento del aire contenido en el intestino y evitar su excesiva distensión.

A continuación, se sitúan ambas llaves en posición jeringa-exterior, con lo que el intestino se convierte en un compartimento estanco, y se pone en marcha el cronómetro.

La toma de muestras se realiza cada cinco minutos de forma alternativa por cada una de las jeringas, empezando por la distal. Se obtienen así seis muestras durante los 30 minutos que dura el ensayo además de la muestra inicial, que es una alícuota de la solución de perfusión y que representa la concentración inicial de fármaco ensayada.

Para obtener las muestras, se toma aire con la jeringa opuesta a la de muestreo y se colocan las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se succiona el líquido con la jeringa que corresponde a la toma de muestra y, a la vez, se bombea aire con la jeringa opuesta. Una vez recuperado el máximo volumen de la solución perfundida, se sitúan las dos llaves en posición intestino-exterior y se toma una alícuota de 200 μ L con ayuda de una micropipeta. A continuación, se devuelve el líquido remanente al interior del intestino. Para ello, se coloca la llave distal en posición jeringa-intestino y la llave proximal en posición intestino-exterior para facilitar la salida del aire que es desplazado por el líquido. Una vez

introducida la solución, se colocan las llaves en posición jeringa-exterior, convirtiendo de nuevo el intestino en un compartimiento estanco.

La toma de muestra se inicia 15 segundos antes del tiempo de muestreo y no debe durar más de 45 segundos si se desea obtener cinéticas de absorción reproducibles. La toma de muestra se realiza a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. No es conveniente prolongarla durante más tiempo ya que se produciría una reabsorción excesiva de agua.

Las alícuotas correspondientes a cada tiempo de muestreo se colocan en tubos "Eppendorff" convenientemente rotulados y se guardan en congelador (-30°C) hasta el momento de su valoración.

Una vez tomadas todas las muestras, se extrae el líquido remanente en el intestino, siguiendo las pautas expuestas en el *Epígrafe 2.2.6*, y se mide su volumen.

Finalizado el ensayo, se sacrifica el animal por punción del diafragma.

2.2.6 Ensayo de reabsorción de agua

En los ensayos de absorción se observó que la suma del volumen remanente a los 30 minutos más el volumen extraído en la toma de muestras era inferior al 90% del volumen perfundido inicialmente. Existe, por lo tanto, un proceso de reabsorción de agua que se debe considerar para no falsear por exceso los valores de la concentración de salbutamol en las muestras intestinales (*Doluisio J.T. y col., 1969*).

Por esto, es importante determinar los volúmenes remanentes reales en la luz del intestino a los distintos tiempos de muestreo, ya que permiten corregir los valores de las concentraciones experimentales en el ensayo de absorción. La determinación de los volúmenes remanentes se ha realizado mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio y recogido en la literatura (*Martín Villodre A. y col., 1986; Sancho-Chust V. y col., 1995*).

El proceso de reabsorción sigue una cinética aparente de orden cero (*Martín Villodre A. y col., 1986; Gabus Sannié C. y Buri P., 1987*). Por lo tanto, la

ecuación que describe el proceso de reabsorción de agua en cada ensayo experimental puede definirse por el valor del volumen remanente medido a los cero y a los 30 minutos.

Para determinar el valor del volumen remanente a tiempo cero, la preparación del animal y la técnica quirúrgica es semejante a la indicada en los *Epígrafes* 2.2.4 y 2.2.5; la única diferencia es que inmediatamente después de la perfusión de la solución de ensayo, se hace una única medida del volumen remanente. La recuperación de la totalidad del volumen se realiza desconectando la cánula de la jeringa opuesta a la utilizada para perfundir la solución, que se coloca en el interior de un tubo de centrifuga de 20 mL de capacidad. Con la jeringa que queda conectada se toma aire y se presiona el émbolo, de forma que salga el líquido perfundido a través de la cánula. Seguidamente, con ayuda de unas tijeras de punta fina, se separa el tramo intestinal canulado y se corta el mesenterio liberando, poco a poco, las asas intestinales. El resto del líquido que queda en el interior del lumen intestinal se recupera haciendo una ligera presión con las yemas de los dedos sobre el intestino con ayuda de un algodón húmedo, asegurando que se vacíe completamente.

Por otra parte, en el ensayo de absorción se determina el volumen remanente a los 30 minutos para cada animal perfundido. El procedimiento que se sigue es idéntico al descrito para tiempo cero.

El líquido recuperado se centrifuga durante 10 minutos a 3000 r.p.m. para separar los restos de mucosa susceptibles de haberse arrastrado. Tras retirar estos restos, se mide el volumen con ayuda de una pipeta y de una jeringuilla de insulina. El volumen de líquido obtenido más el extraído durante la toma de las muestras experimentales, constituye el volumen remanente total a los 30 minutos.

Con el valor del volumen remanente medio a cero minutos ($n=5$) y el valor del volumen remanente individual a 30 minutos se obtiene, gráficamente, una recta a partir de la cual pueden calcularse los valores de los volúmenes remanentes teóricos para cada tiempo de muestreo y para cada animal, pudiéndose

corregir las concentraciones remanentes del fármaco ensayado en las muestras intestinales.

2.2.7 Ensayo de degradación

Es importante tener la seguridad de que la disminución aparente de la concentración de salbutamol en las muestras, a los diferentes tiempos de ensayo, se debe, exclusivamente, a la absorción del fármaco y no intervienen otros factores incontrolados. Por ello, se ha considerado conveniente realizar ensayos complementarios para estudiar la posible degradación del fármaco durante los ensayos de absorción, bien a causa de la temperatura a que se encuentra sometido en el interior del lumen intestinal, bien por la acción de bacterias de la flora intestinal. El estudio se ha realizado en un único ensayo en el que se controlan a la vez ambos factores.

Se han utilizado cuatro animales de experimentación por cada condición de ensayo. Se ha practicado la misma técnica que la descrita en los ensayos de absorción, pero en este caso, las soluciones de perfusión estaban todas ellas exentas de salbutamol y constituídas por:

- 1) líquido de lavado
- 2) líquido de lavado adicionado de verapamilo 20 mM
- 3) líquido de lavado en presencia de azida sódica 6 mM
- 4) líquido de lavado y zumo de pomelo natural.

Se han utilizado únicamente las concentraciones mayores de verapamilo y de azida sódica para tener la seguridad de que su presencia no interviene en una posible degradación.

La solución de perfusión se mantiene en el interior del intestino durante el tiempo que dura el ensayo de absorción (30 minutos), sometiéndose a un muestreo simulado cada cinco minutos, con el fin de reproducir exactamente las condiciones experimentales que prevalecen en los ensayos de absorción.

El líquido recogido se filtra a través de papel "Whatman" nº 1, cuyo diámetro de poro permite el paso de las posibles bacterias suspendidas en la solu-

ción, pero, en cambio, retiene los residuos sólidos, fundamentalmente mucosos, de procedencia intestinal.

Este líquido se mezcla en proporción volumétrica 19:1 con una solución que contiene salbutamol a una concentración 20 veces mayor a la de la solución inicial de perfusión, es decir, salbutamol 5.8 mM. De este modo, la solución resultante contiene la misma concentración de salbutamol y de los distintos componentes ensayados que las soluciones iniciales de perfusión, mientras que el líquido procedente del intestino ha sufrido una dilución mínima y contiene una cantidad teórica de bacterias muy similar (aproximadamente el 95%) a la que puede contener la solución de perfusión en el interior del intestino, cuando se practica el ensayo de absorción.

La solución resultante se divide en cuatro alícuotas, que se colocan en tubos "Eppendorff". Una de ellas se utiliza como solución de referencia y se congela inmediatamente (-30°C) hasta el momento de la valoración para impedir cualquier reacción de degradación. Las tres restantes se incuban en un baño termostático a 37°C durante un tiempo previamente fijado y distinto para cada alícuota. En concreto, los tiempos de incubación fueron 10, 20 y 30 minutos.

Tras la incubación se congelan también las muestras a -30°C para detener la posible degradación y conservarlas hasta su posterior valoración.

La concentración de salbutamol en las muestras se determina utilizando la misma técnica analítica empleada en los ensayos de absorción, tomando como patrón externo la solución de referencia no incubada (0.29 mM).

Como valor representativo de la concentración existente a cada uno de los tiempos de incubación se considera el promedio de los cuatro ensayos realizados para cada una de las soluciones.

2.2.8 Determinación de la constante aparente de velocidad de absorción

2.2.8.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Los volúmenes remanentes a los distintos tiempos se ajustan, como ya se ha indicado anteriormente, a una cinética de orden cero (*Martín Villodre A. y col., 1986*), cuya ecuación diferencial representativa es la siguiente:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

La forma integrada de la ecuación anterior es:

$$V_t = V_0 - k_0 \cdot t \quad \text{Ecuación 2.2}$$

en la que V_t representa el volumen remanente en el lumen intestinal a cada tiempo, V_0 es el volumen remanente a tiempo cero y k_0 representa la constante de velocidad de reabsorción, expresada en mL/min.

La cinética de reabsorción de agua se ha calculado individualmente para cada animal, obteniendo los volúmenes remanentes teóricos a cada tiempo de muestreo que se han utilizado para corregir las concentraciones remanentes de fármaco en el lumen, en cada ensayo de absorción.

2.2.8.2 Cálculo de las concentraciones de fármaco remanentes en el lumen intestinal

Tras la obtención de las muestras intestinales, se procede a la valoración del fármaco siguiendo la técnica descrita en los *Epígrafes 2.4.1. y 2.4.2.*

Se inyecta una alícuota de la solución inicial de perfusión, que se utiliza como patrón. A continuación, se inyectan las muestras biológicas, obteniéndose

el área del pico correspondiente a cada una de ellas. Para obtener la concentración de salbutamol en cada muestra se aplica la siguiente expresión:

$$C_e = \frac{P_t}{P_i} \cdot C_i \quad \text{Ecuación 2.3}$$

en la que C_e es la concentración experimental remanente en el lumen intestinal para cada tiempo de toma de muestra, P_t es el área del pico cromatográfico de la muestra a cada tiempo de muestreo, P_i el área del pico de la solución inicial y C_i la concentración de fármaco de la solución inicial.

Las concentraciones experimentales, C_e , así halladas, se corrigen para la reabsorción de agua, obteniéndose las concentraciones remanentes corregidas para cada tiempo, de acuerdo con la *Ecuación 2.4.*:

$$A = C_e \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

en la que A representa la concentración remanente experimental en el lumen intestinal una vez corregida para la reabsorción de agua, V_t el volumen remanente al tiempo considerado (obtenido según la *Ecuación 2.2*) y V_0 el volumen remanente medio obtenido a tiempo cero.

Durante el intervalo de tiempo empleado en los ensayos de absorción (30 minutos), la cinética de orden uno es perfectamente funcional, según la ecuación:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A \quad \text{Ecuación 2.5}$$

siendo su forma integrada la siguiente:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

en la que A representa la concentración remanente de salbutamol en lumen a un tiempo t , A_0 la ordenada en origen y k_a la constante aparente de velocidad de absorción de orden uno, expresada en tiempo recíproco (t^{-1}).

En todos los casos, el valor de la ordenada en origen (A_0) ha sido ligeramente inferior a la concentración inicial perfundida. Ello es debido a que, tras perfundir la solución de la sustancia ensayada en el intestino, se produce, de forma inmediata, un proceso de adsorción del fármaco a la mucosa intestinal, que se considera concluido antes de cinco minutos (*Doluisio y col., 1970*). A este fenómeno, además, se puede sumar la posible dilución de la solución de perfusión con restos de líquido de lavado presentes en el lumen intestinal tras su vaciado del intestino. Por este motivo, para el cálculo de la constante de absorción sólo se utilizan los valores comprendidos entre 5 y 30 minutos, sin tener en cuenta el valor a tiempo cero. Los datos así obtenidos permiten asegurar la fiabilidad de los valores de k_a determinados (*Foradada A. y col., 1974; Doluisio J.T. y col., 1970*).

Tomando logaritmos neperianos, la *Ecuación exponencial 2.6* se puede convertir en una recta cuya expresión es la siguiente:

$$\ln A = \ln A_0 - k_a \cdot t \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Mediante **regresión lineal** por mínimos cuadrados de los logaritmos neperianos de las concentraciones remanentes de fármaco en el lumen intestinal frente al tiempo de toma de muestra, se obtienen los valores preliminares de los parámetros k_a y A_0 , que sirven como estimas iniciales para el ajuste por regresión no lineal.

Para la obtención de los parámetros individuales característicos del proceso de absorción, k_a y A_0 , se ha utilizado un programa informático (SIGMA PLOT 6.0.) que realiza el ajuste de la *Ecuación 2.6* mediante **regresión no lineal** por mínimos cuadrados ordinarios, basado en el algoritmo de *Marquardt-Levenberg*. También se obtienen otros parámetros estadísticos que nos indican la bondad del ajuste, como la suma de cuadrados (ss) y el coeficiente de correlación (r) entre los valores experimentales y predichos por el modelo.

Una vez obtenida la constante aparente de velocidad de absorción del salbutamol en cada animal de experimentación, se calcula la media de ocho determinaciones, valor que se considera representativo para cada condición de ensayo.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD *IN VITRO*

Los experimentos realizados para determinar la permeabilidad aparente del salbutamol han tenido como sustrato dos líneas celulares diferentes.

En primer lugar se han utilizado las células Caco-2 TC7. Como se describió en el capítulo anterior, se trata de un clon aislado a partir de células de cáncer de colon humano. Estas células se caracterizan por sobreexpresar la glicoproteína P en su membrana apical, lo que puede conducir a una disminución en el rendimiento neto del proceso de absorción del fármaco.

También se ha utilizado la línea celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), aislada a partir de células renales de perro.

Los protocolos de trabajo y soluciones utilizadas en cada una de las líneas celulares son, básicamente, los mismos, con ligeras variaciones que son adecuadas para las células MDCK.

Ambos tipos de células se han cultivado en botellas de plástico especiales para cultivos celulares de 75cm² de superficie.

Estas células, para crecer requieren la presencia de un medio de cultivo completo y deben mantenerse en un incubador a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y O₂ al 95%, con una humedad relativa del 90%.

Toda manipulación de las células se ha desarrollado en condiciones de esterilidad, utilizando una cámara de flujo laminar vertical de seguridad biológica, para evitar posibles contaminaciones microbiológicas.

Además, todas las soluciones de trabajo eran estériles y estaban atemperadas a 37°C.

2.3.1 Soluciones de trabajo

La composición del medio de cultivo de las células Caco-2 TC7 es la siguiente:

*DMEM (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium), que contiene glucosa 25 mM y NaHCO_3 3,7 g/L a pH 7.4.

*L-glutamina 4 mM.

*Solución de aminoácidos no esenciales 1% (V/V).

*Suero bovino fetal 10% (V/V), inactivado a la temperatura de 56°C durante 30 minutos.

*Estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y penicilina 100 mU/mL.

En ocasiones, se puede adicionar gentamicina o fungizona como antibióticos.

La composición del medio de cultivo de las células MDCK es la misma pero carece de aminoácidos no esenciales, porque no resultan necesarios para su crecimiento. Además, el suero bovino fetal se sustituye, normalmente, por suero de caballo, más económico y que no interfiere en el crecimiento de estas células.

La glutamina es un aminoácido esencial, que se adiciona al medio de cultivo como complemento nutritivo, al igual que los aminoácidos no esenciales. El suero bovino fetal constituye un suplemento proteico para las células. La penicilina y la estreptomina evitan la proliferación bacteriana. La gentamicina y la fungizona impiden el crecimiento de levaduras.

Para el mantenimiento de las células se utilizan también, las siguientes soluciones:

- ✓ D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline): solución salina exenta de calcio y magnesio, tamponada con fosfatos de Dulbecco, a pH 7.4. Es una solución que se emplea para el lavado de las células.

- ✓ Tripsina-EDTA: compuesta por tripsina 0.25% (1:250) y EDTA 10 mM en D-PBS regulado a pH 7.4. Se utiliza para despegar las células de los frascos donde se cultivan.

En los experimentos de transporte, se requieren soluciones, no necesariamente estériles, como:

- ✓ Solución tampón a pH 7.4: formada por Hank's Balance Salt Solution (HBSS) y HEPES 10 mM. La sal de Hank's está constituida por Ca Cl₂, MgSO₄, KCl, NaCl, Na₂HPO₄ y D-glucosa. Esta solución se utiliza también para disolver los fármacos con los que se realizan los estudios de permeabilidad. Asimismo constituye la solución que se repone al tomar cada muestra, durante los experimentos de transporte.
- ✓ D-PBS⁺⁺: solución de D-PBS con calcio 10 mM y magnesio 10 mM. El calcio y el magnesio se adicionan porque refuerzan la integridad de la monocapa celular.

El salbutamol se ha utilizado a la concentración de 100 µM. Se ha utilizado en solución exenta de aditivos y adicionado de verapamilo a concentración 100 µM o de probenecid a concentración 100 µM. También se ha utilizado en presencia de zumo de pomelo en proporción volumétrica 1:3, es decir, una parte de zumo de pomelo natural y tres de tampón a pH 7.4.

Las soluciones se prepararon a partir de soluciones madre de salbutamol (7.5 mM), verapamilo (10 mM) y probenecid (1mM). Las soluciones madre se conservan, como alícuotas, en el congelador. Se descongelan momentos antes de su utilización. Previo su uso, se diluyen.

2.3.2 Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares se han mantenido en una estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 95% de O₂, 5% de CO₂ y una humedad relativa del 90%. Estas condiciones son las adecuadas para su crecimiento. Cada dos días se ha renovado el medio de cultivo. Para ello es necesario llevar a cabo todas las manipulaciones en condiciones de asepsia. El medio de cultivo se aspira, con ayuda de una bomba de vacío, y se sustituye por medio nuevo, atemperado a 37°C.

2.3.2.1 Crecimiento en frascos

Las células se cultivan en frascos de plástico estériles de 75 cm² de superficie, formándose una monocapa celular que queda adherida a la base de dichos frascos. Para que se produzca un crecimiento adecuado de la monocapa deben controlarse, fundamentalmente, dos aspectos:

1º) Realizar el cambio de medio cada dos días, ya que las células agotan los nutrientes y producen residuos metabólicos que pueden alterar el pH del medio.

2º) Controlar la densidad del crecimiento celular mediante técnicas microscópicas. Una vez formada la monocapa, las células se deben cambiar a un frasco nuevo para mantener el cultivo en línea, en caso contrario se inicia la apoptosis. El cambio del medio de cultivo se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo: se extrae el frasco del incubador y se introduce en la cámara de flujo laminar. La botella de medio de cultivo atemperado se introduce también en la cámara, pulverizándola, previamente, con alcohol del 70%.

Una vez está seco el alcohol, se abren parcialmente los tapones del frasco y de la botella del medio de cultivo. Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, conectada a una bomba de vacío, se aspira el medio de cultivo remanente en el frasco. A continuación, con una pipeta estéril, acoplada a un pipeteador automático, se depositan, en el frasco, 20 mL de medio de cultivo fresco, procurando no tocar ni las paredes del frasco ni el borde de la botella. El frasco se cierra y se introduce nuevamente en la estufa.

2.3.2.2 Pase celular

Se denomina pase celular al proceso que se realiza para trasvasar las células, una vez que han alcanzado el estado de subconfluencia, de un frasco de 75 cm² a otro vacío.

Las células, una vez que se siembran en un frasco vacío y en presencia de un medio de cultivo nutritivo, comienzan a dividirse y a crecer. Cuando cubren totalmente la superficie de la botella, llegan a un estado de confluencia celular. No pueden dividirse más y comienza un proceso de diferenciación celular, con el consiguiente desarrollo de enzimas y demás elementos característicos de las células diferenciadas. Las líneas celulares se mantienen con células indiferenciadas, por tanto, cuando las células están en un estado de subconfluencia, o lo que es lo mismo, cuando todavía quedan espacios vacíos entre las células, éstas deben pasarse a otro frasco, que se denomina PASE CELULAR, y se realiza de acuerdo con la siguiente secuencia:

1º) Lavado de las células: se retira el medio de cultivo y se lavan tres veces con PBS a 37°C, con objeto de eliminar desechos del metabolismo celular.

2º) Desadherencia de las células de la superficie del frasco: se adiciona solución de tripsina-EDTA y se incuban a 37°C durante unos 2-3 minutos, de modo que las células se despegan del sustrato donde crecen y también se separan entre sí. El proceso se completa por adición de medio de cultivo.

3º) Centrifugación de la suspensión celular, a 1000-1500 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente y aspiración del sobrenadante.

4º) Resuspensión del sedimento celular en D-MEM completo

5º) Siembra en frasco a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células por 75 cm².

Para ello se debe preparar una dilución, con medio de cultivo atemperado, 1/6 para las Caco-2 TC7, y 1/20 para las MDCK.

En estas condiciones, las células confluyen en 4-5 días.

2.3.2.3 Congelación celular

El proceso de congelación permite mantener las células inmersas en nitrógeno líquido de forma indefinida y disponer, por lo tanto, de una reserva celular.

Durante este proceso, las células se ven sometidas a distintos procesos que pueden comprometer la integridad celular, tales como formación de cristales de hielo o desnaturalización de proteínas.

Para la congelación celular se ha utilizado un medio especial que presenta la siguiente composición:

- *10% de suero bovino fetal inactivado.
- *10% de DMSO (dimetil sulfóxido)
- *80% de medio de cultivo completo DMEM.

El DMSO se utiliza como agente crioprotector pero, al mismo tiempo, resulta extremadamente tóxico para las células (*Jakoby W. y col., 1979; Kruse P. y col., 1973; Freshney R.I., 1986*), por lo que la congelación debe realizarse rápidamente. Si no se adicionara DMSO, la congelación resultaría letal para las células, ya que durante el proceso se formarían cristales de hielo en el citoplasma, comprometiendo su integridad.

Para realizar la congelación celular, las células se despegan del frasco, tal como se ha descrito en el epígrafe anterior, pero el sedimento celular se resuspende en el medio de congelación. Las células resuspendidas se introducen en tubos de criocongelación y, rápidamente, se llevan a -80°C . Al día siguiente se traspan a un tanque de nitrógeno líquido, donde pueden permanecer durante largos periodos de tiempo.

2.3.2.4 Descongelación celular

La descongelación celular se debe realizar, al igual que la congelación, rápidamente. De este modo, aseguramos que las células están el menor tiempo posible en contacto con el DMSO.

Se extrae un vial de criocongelación del tanque de nitrógeno líquido y se lleva, inmediatamente, a un baño termostataado a 37°C. Una vez descongelado, se traspara el contenido a un tubo de centrifuga que contiene un pequeño volumen de medio de cultivo completo, de este modo, se diluye el DMSO. Se centrifugan las células, del mismo modo que cuando se realiza un pase celular, y el sedimento se resuspende en medio de cultivo completo. A partir de este momento, se procede como si se realizara un pase celular.

2.3.3 Ensayo de permeabilidad

2.3.3.1 Siembra celular

Para los experimentos de transporte, las células se siembran con una densidad de $4 \cdot 10^5$ células/cm², sobre filtros permeables de policarbonato. Estos filtros presentan un área de 1.13 cm² y un diámetro de poro de 0.45 µm. Se montan sobre anillos insertados en una placa multipocillo para cultivo.

Dada la densidad de la siembra inicial, las células adquieren la confluencia a las 48 horas, a partir de este momento se inicia un proceso espontáneo de diferenciación que se estabiliza, para la Caco-2 TC7, a partir del día 17 al 21 después de la siembra, y a partir del 5 al 10 tras la siembra para las MDCK.

El monoestrato celular diferenciado sobre el filtro de policarbonato forma un sistema de dos compartimentos: uno APICAL (AP), que corresponde in vivo al lumen intestinal, y uno BASOLATERAL (BL), que corresponde in vivo al espacio intersticial en contacto con los capilares sanguíneos. Ambos se encuentran separados por el filtro que contiene monoestrato.

Cada pocillo presenta dos cámaras una APICAL y otra BASOLATERAL, tal como se indica en la **Figura 2.2**. En cada cámara se introduce un volumen

determinado de medio de cultivo. éste se cambia cada dos días, aspirando primero el medio BL y después el AP. Con ello se evita que la presión hidrostática del medio remueva el monoestrato celular.

Este sistema garantiza el libre acceso de los nutrientes a ambos lados del monoestrato celular y permite determinar el flujo trans-epitelial de moléculas.

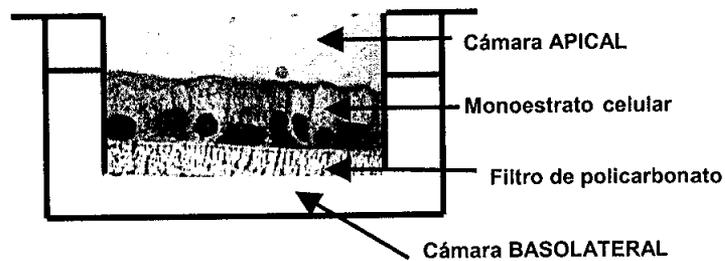


Figura 2.2: Esquema del montaje experimental

2.3.3.2 Control de la integridad del monoestrato

La integridad del monoestrato celular y la formación de uniones funcionalmente estrechas se ha controlado midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y el paso a través de la membrana de un marcador del espacio extracelular, el rojo fenol.

El proceso de diferenciación celular, que se corresponde con la formación de uniones funcionalmente estrechas entre las células del monoestrato, va acompañado de un aumento de los valores de TEER y de un descenso paralelo del paso de rojo fenol.

La TEER se ha cuantificado mediante un aparato Millicell ERS (*Millipore, Bedford, MA, USA*) provisto de un electrodo de plata/cloruro de plata, que inmerso, respectivamente, en el medio AP y BL, mide la resistencia eléctrica a través del filtro y, por tanto, la resistencia que genera el monoestrato celular.

A los valores de TEER obtenidos se les ha restado el valor de TEER correspondiente a un filtro carente de monocapa celular (100 Ω). El valor resultante

se ha multiplicado por la superficie total del filtro (1.13 cm^2) y se ha expresado en $\Omega \cdot \text{cm}^2$. En todos los casos, los valores de TEER corregidos medidos para las Caco-2 TC7 estuvieron alrededor de $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y para las MCDK alrededor de $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

El rojo fenol se ha incorporado a las soluciones de salbutamol ensayadas a la concentración $100 \mu\text{M}$. De este modo, el rojo fenol se encuentra siempre en el compartimento dador. Al finalizar el experimento se ha recogido la muestra y, mediante espectrofotometría, se ha determinado la concentración de rojo fenol. Se considera que la integridad de la membrana se mantiene cuando el paso de rojo fenol, al cabo de una hora, no supera el 1% de la concentración inicial.

2.3.3.3 Experimento de transporte

El sistema de filtros de policarbonato permite evaluar el transporte en ambas direcciones, AP-BL y BL-AP. Cuando se estudia el transporte BL-AP, se mantienen las condiciones experimentales, con la excepción de que la sustancia ensayada se añade al compartimento BL y las muestras se recogen en el compartimento AP.

Observando las características del transporte en ambos sentidos, se pueden establecer diferencias en cuanto al nivel de expresión o regulación de los transportadores de membrana.

Antes de iniciar el experimento de transporte, las células deben lavarse dos o tres veces con PBS, al que se le ha adicionado calcio y magnesio. Estos dos cationes se incorporan para reforzar las uniones estrechas entre las células del monoestrato. La solución de lavado se encuentra a temperatura de 37°C .

El lavado celular se realiza para asegurar la ausencia total de rojo fenol procedente de restos del medio de cultivo. En caso contrario, se podría cuantificar un paso a través de la membrana de rojo fenol superior al real.

El pH de la zona adyacente a la superficie de los villis es más ácido (entorno a pH 6.0) que el de la zona próxima a la superficie serosa y capilares sanguíneos (alrededor de 7.4). Para reproducir estas condiciones, en los experimen-

tos de transporte transepitelial se utilizan soluciones tamponadas, de manera que aquellas que están en contacto con la cara luminal presentan un pH de 6.0 y las que están en contacto con la cara basal presentan un pH de 7.4.

En la especie humana, el pH del tracto gastrointestinal aumenta desde los primeros tramos del duodeno (pH ácido) hasta el íleo distal (pH neutro). Por ello, algunos autores prefieren utilizar soluciones tamponadas a pH 7.4 (valor fisiológico de la sangre) en ambos compartimentos, AP y BL.

Para los ensayos realizados en esta Memoria se ha elegido esta última opción. Por lo tanto, después de lavar las células, se han adicionado 500 μ L de tampón a pH 7.4 en la parte apical y 1000 μ L en la basolateral.

Seguidamente, la placa se ha introducido en un incubador provisto de un sistema de giro circular y un termostato. La velocidad de giro se reguló a 50 r.p.m. y la temperatura a 37°C. De este modo, se simulan las condiciones fisiológicas tanto de motilidad como de temperatura.

En los ensayos, el salbutamol se ha incorporado en el compartimento dador y, los diferentes inhibidores, tanto en el dador como en el aceptor. A intervalos de tiempo preestablecidos, se debe recoger la totalidad del medio presente en el compartimento aceptor, reestableciéndolo por medio fresco (tampón a pH7.4) a 37°C. Procediendo de este modo, se garantiza el mantenimiento de las condiciones de sumidero en el compartimento aceptor. En caso contrario, se podría anular el transporte de la sustancia problema.

El estudio del transporte del salbutamol se ha realizado en ambas direcciones: de AP a BL y de BL a AP.

Cuando los experimentos se han realizado en dirección AP-BL, el fármaco se ha adicionado en la cámara apical y se ha recogido una muestra en la cámara BL al cabo de una hora. Cuando el transporte se ha evaluado en dirección BL-AP, se ha procedido del mismo modo pero la solución de ensayo se ha profundido en la parte BL y la muestra se ha recogido en la cámara apical, a los 30' de iniciar el ensayo.

Al final del experimento es indispensable verificar la integridad de la monocapa celular. Si ésta no se mantiene, se puede deber a fenómenos de toxicidad que afecten a las uniones estrechas de las células. La apertura de las mismas implica un aumento del paso intercelular de moléculas y no del transporte transcelular, por lo que puede falsear el valor de la permeabilidad aparente.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

La valoración cuantitativa del salbutamol se ha realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.4.1 Elementos cromatográficos.

Se ha utilizado un cromatógrafo líquido-líquido de alta resolución (HPLC), compuesto por los siguientes elementos:

- * Bomba HP 1050.
- * Inyector automático Perkin-Elmer modelo ISS 200.
- * Detector fluorimétrico modelo HP 1046.
- * Integrador Perkin-Elmer modelo 1020.

El sistema cromatográfico empleado es de reparto y de fase inversa. La fase estacionaria consta de:

- Una columna de acero inoxidable "Spherisorb S-5 ODS-2" de 150 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, rellena de gel de sílice silanizado con radicales alifáticos de 18 átomos de carbono, con un tamaño de partícula de 4 μm .

- Precolumna "Tecnochroma", con dos filtros de 2 μm de poro y un relleno pelicular análogo al de la columna pero con un tamaño de partícula de 40 μm . Su función es retener las partículas de mayor tamaño que dañarían la columna si llegaran hasta ella.

La fase móvil utilizada se compone de una mezcla de metanol (calidad HPLC) y de solución acuosa de ácido fosfórico 30 mM (pH 4) en proporción 21:79 (V/V).

La solución de ácido fosfórico es la siguiente:

KH₂PO₄8.165 g
Agua bidestilada c.s.p.....2000 mL

El pH se ajusta a 4 con ácido ortofosfórico (84-86%).

La fase móvil, antes de su uso, se hace pasar a través de un filtro "Millipore GVWP" de 0.22 µm de diámetro de poro, con ayuda de un dispositivo de filtración por vacío. Esta operación permite desgasificar la muestra y eliminar la presencia de partículas sólidas susceptibles de dañar la columna.

El detector se ha ajustado a una longitud de onda de 229 nm para la excitación y de 306 nm para la emisión. Estas longitudes de onda se seleccionaron tras realizar un barrido de una solución de salbutamol en un fluorímetro. Debido a la diferencia de órdenes de magnitud de las concentraciones utilizadas en los ensayos *in situ* e *in vitro*, la sensibilidad del detector se ha modificado según la concentración empleada.

Para la fase eluyente se ha utilizado un flujo constante de 1 mL/min. El volumen de inyección en el cromatógrafo ha sido de 20 µL para las muestras intestinales y de 100 µL para las celulares. En estas condiciones, el pico de salbutamol presenta un tiempo de retención de 3.3 minutos.

Para la valoración de la antipirina se ha utilizado el mismo sistema de valoración, es decir, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este caso, el cromatógrafo utilizado estaba formado por los siguientes componentes:

- * Bomba isocrática Perkin-Elmer modelo serie 10.
- * Inyector automático Perkin-Elmer modelo ISS 200.
- * Detector espectrofotométrico Perkin-Elmer LC-90.
- * Integrador Perkin-Elmer modelo 1020.

Se ha utilizado un sistema de reparto y de fase inversa. La fase estacionaria estaba constituida por una columna de acero inoxidable "Nova Pack" de 150 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, rellana de gel de sílice silanizado con radicales alifáticos de 18 átomos de carbono, con un tamaño de partícula de 4 μm . La precolumna utilizada fue la misma que se ha descrito anteriormente.

La fase móvil utilizada (previamente filtrada) ha sido una mezcla de acetonitrilo y una solución de ácido ortofosfórico 0.01M ajustada a pH 4.5 en proporción volumétrica 15/85. El volumen de inyección ha sido 20 μL . En estas condiciones el tiempo de retención de la antipirina ha sido de 4.5 minutos.

La longitud de onda seleccionada fue 254 nm.

2.4.2 Preparación de las muestras

Las muestras biológicas procedentes del ensayo de absorción presentan a menudo restos sólidos en suspensión procedentes, generalmente, de la mucosa intestinal. Para evitar que estos restos interfieran en la valoración y/o que produzcan una obturación de la columna cromatográfica, es necesario centrifugar las muestras a 3000 r.p.m. durante 10 minutos antes de realizar su valoración cuantitativa, inyectándose el sobrenadante.

Las muestras procedentes de los ensayos celulares no han necesitado ningún tratamiento previo.

2.5 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Ensayos de linealidad

Se ha realizado una recta de calibración para el salbutamol y otra para la antipirina. De esta manera se demuestra, por una parte, que existe linealidad entre las concentraciones de soluto ensayadas y las áreas de pico obtenidas y, por otra parte, se determina si la recta de calibración presenta o no, ordenada en el origen.

Las soluciones patrón se preparan a partir de una solución madre de salbutamol 0.4 mM obtenida en las mismas condiciones que las soluciones de perfusión. Las concentraciones de salbutamol en las soluciones patrón son: 0.3, 0.2, 0.15, 0.1 y 0.05 mM. Se inyectan 20 μL de cada solución en el cromatógrafo, realizando tres determinaciones para cada uno de los patrones utilizados.

En las experiencias en las que se parte de concentraciones de salbutamol más altas que la de 0.3 mM, se procedió a su dilución con objeto de que las concentraciones obtenidas se hallaran incluidas en el ámbito de valores indicados.

Puesto que la concentración de salbutamol utilizada en los ensayos con cultivos celulares es muy inferior a las utilizadas en los ensayos *in situ*, se realizó, del mismo modo, una recta de calibración a partir de una solución madre 10 μM . Las concentraciones de salbutamol en las soluciones patrón fueron: 2 μM , 1 μM y 0.5 μM , que abarcan las concentraciones obtenidas experimentalmente. Se inyectaron 100 μL de cada solución, valorándose por triplicado.

Para la antipirina la solución madre se ha preparado a la concentración 1.6 mM. El intervalo de concentraciones patrón ha sido 1.33, 0.66, 0.33, 0.166 mM. Se han inyectado igualmente 20 μL de cada solución en el cromatógrafo, realizando tres determinaciones para cada uno de los patrones utilizados.

La recta que se obtiene al representar gráficamente las áreas medias de los picos cromatográficos frente a las concentraciones ensayadas se puede definir mediante las ecuaciones siguientes:

$$A = b \cdot C \quad \text{Ecuación 2.8}$$

$$A = a + b \cdot C \quad \text{Ecuación 2.9}$$

en la que A representa el área del pico cromatográfico, C representa la concentración de fármaco en la solución patrón, b representa la inclinación de la recta y a representa la ordenada en el origen.

Cada una de estas ecuaciones se ajusta a los datos experimentales. Se realiza la prueba F de Snedecor que ayuda a elegir la ecuación que mejor define a la recta de calibrado.

2.5.2 Ensayos de precisión y exactitud

Estos ensayos se han realizado para validar la técnica analítica utilizada en la determinación del salbutamol y de la antipirina (HPLC).

Respecto a los ensayos *in situ*, se han preparado tres diluciones de cada una de las soluciones de perfusión ensayadas. La concentración de salbutamol en las soluciones patrón ha sido 0.3 mM y las concentraciones teóricas del mismo en las diluciones de referencia han sido 0.2, 0.15 y 0.1 mM. La concentración de antipirina en la solución patrón ha sido 1.6 mM y las concentraciones teóricas de la misma han sido 1.33, 0.66, 0.33, 0.166 mM. Cada solución de referencia se ha valorado tres veces.

De los ensayos *in vitro*, se ha preparado una solución patrón de salbutamol 10 μM . A partir de ella, se han preparado diluciones de referencia de 2 μM , 1 μM y 0.5 μM .

La precisión del método de valoración se expresa, para cada concentración ensayada, mediante la desviación estándar y el coeficiente de variación de las tres determinaciones efectuadas; la exactitud se expresa por el error absoluto y relativo de la media de dichas determinaciones.

2.5.3 Límite de cuantificación

El cálculo del límite de cuantificación se ha realizado mediante la siguiente expresión:

$$LC = 10 \cdot s/b$$

donde s representa la desviación estándar de la ordenada en el origen y b la pendiente de la recta de calibración.

2.6 ESTUDIO DEL MECANISMO DE INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO: Ajustado de modelos cinéticos a los datos experimentales obtenidos *in situ*

Para determinar la cinética de incorporación del salbutamol al organismo, se han considerado conjuntamente todos los datos experimentales obtenidos en el intestino delgado de la rata en las siguientes condiciones:

1º) Salbutamol en siete concentraciones crecientes.

2º) Salbutamol 0.29 mM en presencia de distintos inhibidores de procesos de secreción intestinal activos:

- a) Inhibidor competitivo: verapamilo.
- b) Inhibidor metabólico: azida sódica.
- c) Sustancia natural: zumo de pomelo.

Para proceder al ajustado se ha utilizado una ecuación matemática en la que se asume que la absorción intestinal obedece a una cinética de primer orden y que, a su vez, el fármaco sufre un proceso simultáneo de secreción activa desde el enterocito al lumen intestinal.

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

en la que K_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden, A es la concentración de fármaco en el lugar de absorción a tiempo t , Vm_s es la velocidad máxima de secreción y Km_s es la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción. Debe indicarse que en el proceso de secreción, A , debería sustituirse por A' , que sería la concentración en el enterocito, pero, puesto que se desconoce, se ha sustituido por la concentración en lumen.

En presencia de inhibidores del proceso de secreción activa, la *Ecuación 2.10* sufre diferentes modificaciones atendiendo a la naturaleza del inhibidor que se considere:

Cuando se utiliza el verapamilo, la *Ecuación diferencial 2.10* adopta la siguiente expresión:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{km_s \left[1 + \frac{I}{kmI} \right] + A} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

en la que K_a , A , Vm_s , y Km_s ya se han definido en la ecuación anterior, I es la concentración de inhibidor y KmI es la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción del inhibidor.

Cuando se utiliza la azida sódica, se asume que la velocidad de incorporación del fármaco se ve modificada por la concentración de ATP disponible en el medio, de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A \cdot [ATP]}{km_s + A} \quad \text{Ecuación 2.12}$$

A su vez, la variación de la concentración de ATP con el tiempo se ha calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{dATP}{dt} = k_0 \cdot \left(1 - \frac{AZ}{IC_{50} + AZ} \right) - k_0 \cdot [ATP] \quad \text{Ecuación 2.13}$$

donde k_0 es la constante de formación del ATP, de acuerdo con una cinética de orden cero, AZ es la concentración de azida sódica en el medio, IC_{50} es la concentración de azida sódica que inhibe al 50% la actividad de la ATP sintetasa, y $[ATP]$ es la concentración de ATP disponible a tiempo t .

Por último, cuando se ha utilizado el zumo natural de pomelo, la *Ecuación 2.10* se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s \cdot Pkm + A} \quad \text{Ecuación 2.14}$$

En esta ecuación, Pkm es un factor que modifica la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción del salbutamol, de acuerdo con una inhibición competitiva del proceso. Los demás parámetros se han descrito anteriormente.

Los ajustados se han realizado mediante el programa informático Winnonlin 1.0, utilizando el algoritmo Gauss-Newton (Levenberg y Hartley) y el valor $1/A_{\text{teor}}^2$ como factor de ponderación.

2.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se han utilizado tres programas informáticos: Sigmaplot 6.0, SPSS 10.0 y Winnonlin 1.0.

2.7.1 Criterios de calidad de los ajustados

Como criterio de calidad de los ajustados se emplean los parámetros que se describen en los epígrafes siguientes:

2.7.1.1 Coeficiente de correlación

El criterio estadístico establecido para determinar la bondad de los ajustados lineales por mínimos cuadrados en las rectas de calibración, en la determinación de la reabsorción de agua y en los ensayos de absorción, es el coeficiente de correlación, r .

Para los ajustados no lineales, se ha utilizado el coeficiente de correlación entre los valores experimentales y los teóricos predichos por el modelo. De este modo, se puede evaluar el grado de concordancia entre los valores experimentales y teóricos.

En ambos casos, cuanto más se aproxime el valor absoluto de r a la unidad, más fiable será el ajustado.

2.7.1.2 Error estándar de los parámetros

Mediante los programas de ajuste de datos empleados, se obtienen los parámetros estimados, acompañados del error estándar. El error estándar constituye un buen indicador de la fiabilidad del ajustado obtenido, ya que expresa la precisión con la que se ha estimado el parámetro.

2.7.1.3 Coeficiente de variación de los parámetros

El coeficiente de variación de un parámetro es la desviación estándar expresada como porcentaje respecto del valor del parámetro. Constituye un buen indicador de la fiabilidad y precisión del ajustado ya que proporciona información sobre la certeza con la que se ha determinado cada parámetro. El ajustado será tanto más fiable cuanto menores sean los valores de los coeficientes de variación de los parámetros estimados.

2.7.1.4 Suma de cuadrados

La suma de cuadrados se utiliza para juzgar la calidad de los ajustados no lineales.

Representa la suma total de los cuadrados de las diferencias entre los valores experimentales y los teóricos predichos por la ecuación. Cuanto menor sea el valor obtenido de la suma de cuadrados, más fiable será el ajustado. Se debe tener en cuenta que este valor depende del número de valores experimentales utilizados en el ajustado y, en su caso, de la ponderación utilizada.

2.7.2 Criterios de selección de modelo

Una vez realizados los ajustados a los datos experimentales, se selecciona el modelo más adecuado empleando los criterios que se indican a continuación:

2.7.2.1 Ensayo AIC

De acuerdo con el criterio de información de Akaike (AIC) para la comparación de modelos, se cumple:

$$AIC = N \cdot \text{Ln} \sum d_i^2 + 2 \cdot p \quad \text{Ecuación 2.15}$$

donde N equivale al número de términos ensayados, d_i^2 es la suma de cuadrados de los residuales y p el número de parámetros de la ecuación. Se considera más probable el ajustado que presenta un menor valor AIC (o MAICE, siglas de *Minimum AIC Estimation*).

En general este criterio favorece al modelo más sencillo que se compara ya que a mayor complejidad de la ecuación considerada, mayor número de parámetros y por lo tanto, únicamente un valor muy pequeño de la suma de cuadrados haría más probable el modelo más complejo.

2.7.2.2 Prueba F de Snedecor

Esta prueba se ha realizado para conocer la ecuación que mejor define la recta de calibrado del salbutamol y de la antipirina.

Las Ecuaciones 2.8 y 2.9 se ajustan mediante un programa estadístico adecuado (SIGMA PLOT 6.0) a los datos disponibles, concentraciones y áreas de los picos. La suma de cuadrados y los grados de libertad obtenidos con cada modelo nos permiten calcular el valor experimental F mediante la siguiente expresión:

$$F = \frac{ss_1 - ss_2}{ss_2} \cdot \frac{\delta_2}{\delta_1 - \delta_2} \quad \text{Ecuación 2.16}$$

en la que ss_1 es la suma de cuadrados del modelo con menor número de parámetros y δ_1 sus grados de libertad, y ss_2 y δ_2 la suma de cuadrados y grados de libertad correspondientes al modelo más complejo.

Cuando el valor F experimental es menor que el valor F tabulado en las tablas de Snedecor (para $\delta_1 - \delta_2$, δ_2 y un nivel de significación $\alpha = 0.05$), se considera que no existen diferencias significativas entre los dos modelos y se elige el modelo más sencillo (Ecuación 2.8), que no presenta ordenada en origen.

2.7.3 Pruebas de comparación de medias

En esta Memoria se han utilizado diferentes pruebas paramétricas de comparación de medias de los diferentes grupos de ensayos, fijando un nivel de confianza del 95% de modo que se determina la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de probabilidad p es menor del 5%.

Para poder aplicar este tipo de pruebas paramétricas deben cumplirse las condiciones de que la distribución siga la ley normal y que las varianzas sean homogéneas.

Por ello, antes de realizar el análisis comparativo, se ha realizado un ensayo de homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Levene. Si se cumple que p es mayor de 0.05, es decir si las varianzas son homogéneas, pueden aplicarse:

- a) *Análisis de varianza (ANOVA)* de una o dos vías: se utiliza para determinar si varias medias que se están comparando pertenecen a la misma población o por el contrario proceden de poblaciones distintas.
- b) *Pruebas de comparación múltiple: Prueba de Scheffe*. Cuando el ANOVA determina la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias comparadas, esta prueba permite la comparación entre combinaciones de grupos.

Por otro lado, si no se cumplen los criterios de homocedasticidad, se debe recurrir a pruebas de comparación no paramétricas, como la prueba de *Dunnet T3*.

2.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MDR

2.8.1 Preparación del RNA y síntesis del cDNA

Las ratas se anestesian siguiendo el procedimiento descrito en el *Epígrafe 2.2.4* y se aíslan los diferentes órganos y tejidos en los que se ha analizado la expresión del gen MDR.

El RNA total de esos tejidos se ha extraído utilizando el método de la guanidina isotiocianato-fenol, siguiendo el protocolo de Chomczynski y Sacchi (*Chomczynski P. y Sacchi N., 1987*). La integridad del RNA en las muestras se ha comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa, al que se adicionó bromuro de etidio, y la concentración de RNA se ha determinado mediante espectrofotometría.

El RNA se ha congelado y se ha mantenido a -80°C hasta el momento de su utilización.

Para la síntesis del cDNA, las muestras de RNA se han descongelado lentamente, introduciéndolas en hielo picado. Se han tomado $2\ \mu\text{g}$ de RNA total de cada uno de los tejidos y $0.5\ \mu\text{g}$ del cebador o primer dT16 y se han mezclado con agua DEPC. Este agua está tratada para eliminar RNAsas que podrían degradar el RNA de las muestras. Estas mezclas se han calentado a 70°C durante 5 minutos para romper el apareamiento entre bases, denominados bucles, que pueden existir en las hebras de RNA. Transcurridos 5 minutos, se debe parar la reacción con hielo para evitar que el RNA vuelva a reasociarse consigo mismo. Los eppendorff se han centrifugado 5 segundos a 13000 r.p.m. y a cada uno de ellos se les ha incorporado los siguientes componentes: tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, DTT 10 mM, 40 unidades de RNAsin, $500\ \mu\text{L}$ de cada uno de los nucleótidos trifosfato (dNTP) 500 mM y, 300 unidades de la Transcriptasa Reversa (RT). Los eppendorff se han incubado durante una hora a 42°C .

Pasada esa hora, se ha parado la reacción con hielo y los eppendorff se han congelado a -80°C .

2.8.2 Análisis semicuantitativo del mRNA mediante RT-PCR

Antes de realizar la RT-PCR en las muestras, se debe comprobar que la enzima transcriptasa reversa funciona correctamente. De este modo, las diferencias que se observen entre los niveles de mRNA de los genes (MDR) codificantes de la glicoproteína-P en los diferentes tejidos se deben, únicamente, a que se encuentran en diferente cantidad, y no a un mal funcionamiento de la transcriptasa reversa. Para ello se ha empleado un patrón interno, la ciclofilina (CYC).

Si el producto originado por el mRNA de la ciclofilina se ha amplificado de modo equivalente en todos los tejidos seleccionados, es un indicio de que la enzima transcriptasa inversa ha funcionado adecuadamente en todos los casos.

Para realizar la RT-PCR se necesita diseñar adecuadamente los cebadores, de manera que liguen con las regiones que delimitan los fragmentos de DNA que se quieren amplificar, tal y como se ha explicado en el *Epígrafe 1.3.2*.

Los oligonucleótidos cebadores se han diseñado de manera que detecten el mRNA que codifica para la glicoproteína-P, transcrita a partir del gen MDR. El cebador MDR-U (5'-CAT CGC CTA CGG AGA CAA CA-3') se corresponde con los nucleótidos 3489-3508 de la secuencia de cDNA de la isoforma MDR-1 de la rata. Del mismo modo, el cebador MDR-L (5'-CTG CGT TCT GGA TGG TGG AC-3') corresponde a los nucleótidos 3801-3820 de dicha secuencia (*Silverman J.A. y col., 1991*).

También se han diseñado los cebadores para la ciclofilina. El CYC-U (5'-CGT CTG CTT CGA GCT GTT TG-3') y CYC-L (5'-GTA AAA TGC CCG CAA GTC AA-3') que corresponden a los nucleótidos 99-118 y 543-562, respectivamente, del cDNA de la ciclofilina A de la rata (*Danielson P.E. y col., 1988*), y que han generado un producto de 463 bases.

La reacción de la PCR se ha llevado a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer 2400). En la reacción de la polimerasa deben estar presentes una serie de componentes que favorecen la actividad de dicha enzima. En consecuencia, en los tubos eppendorff, donde posteriormente se va a introducir cada cDNA sintetizado, se debe incorporar la siguiente mezcla de componentes: Tris-HCl 75 mM

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is essential for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. It highlights the need for consistent data collection procedures and the use of advanced analytical techniques to derive meaningful insights from the data.

3. The third part of the document focuses on the role of technology in data management and analysis. It discusses how modern software solutions can streamline data collection, storage, and processing, thereby improving efficiency and accuracy.

4. The fourth part of the document addresses the challenges associated with data management, such as data quality, security, and privacy. It provides strategies to mitigate these risks and ensure that the data remains reliable and secure throughout its lifecycle.

5. The fifth part of the document concludes by summarizing the key findings and recommendations. It stresses the importance of a data-driven approach in decision-making and the need for continuous monitoring and improvement of the data management process.

Capítulo 3

RESULTADOS



3.1 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

3.1.1 Rectas de calibración

En el **Cuadro 3.1** se indican las ecuaciones de la recta de calibración del salbutamol, para los ensayos "in situ", con ordenada y sin ordenada en el origen. También se indican los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales, la suma de cuadrados (SS), el valor AIC y el coeficiente de correlación. Como puede observarse, existe una excelente linealidad entre las áreas y las concentraciones.

Los resultados obtenidos al aplicar la prueba F de Snedecor ($\alpha=0.05$) a los dos tipos de ecuaciones se detallan en el **Cuadro 3.2**. Puesto que la F tabulada es mayor que la calculada, se acepta que la ecuación que mejor ajusta los datos experimentales es la más sencilla (sin ordenada en origen). Por lo tanto, no es necesario realizar una recta de calibración en cada ensayo y las áreas se pueden calcular directamente tomando como patrón externo la solución de referencia.

La representación gráfica de la recta de calibración para el salbutamol se muestra en la **Figura 3.1**. Dicha figura se acompaña de la ecuación de la recta y del coeficiente de correlación correspondiente.

Parámetros	A=b· C	A=a+b· C
a±s	-	$1.01 \cdot 10^5 \pm 1.84 \cdot 10^5$
b±s	$1.80 \cdot 10^8 \pm 3.74 \cdot 10^5$	$1.80 \cdot 10^8 \pm 7.88 \cdot 10^5$
r	0.999	0.999
SS	$2.27 \cdot 10^{11}$	$2.11 \cdot 10^{11}$
AIC	158.91	160.46

Cuadro 3.1 Parámetros obtenidos tras el ajustado de las Ecuaciones 2.8 y 2.9 a los datos experimentales.

Ecuaciones Comparadas	$\delta_1 - \delta_2$	δ_2	F tab	F cal
2.8-2.9	1	4	7.71	0.304

Cuadro 3.2 Comparación estadística, mediante la prueba F de Snedecor, entre las rectas de calibración sin y con ordenada en origen ($\alpha=0.05$).

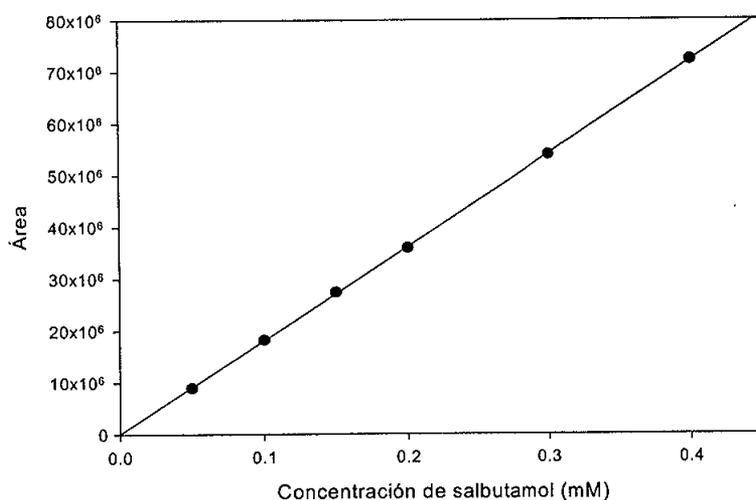


Figura 3.1 Representación gráfica de la recta de calibración obtenida para el salbutamol, definida por la siguiente ecuación: $A=1.800 \cdot 10^8 \cdot C$ ($r>0,999$).

El límite de cuantificación obtenido según los valores de la recta de calibración, a partir de la expresión descrita en el *Epígrafe 2.5.3*, ha sido 0.01 mM.

En el **Cuadro 3.3** se indican las ecuaciones de la recta de calibración de la antipirina, con ordenada y sin ordenada en el origen. También se indican los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales, la suma de cuadrados

(SS), el valor AIC y el coeficiente de correlación. Como puede observarse, existe una excelente linealidad entre las áreas y las concentraciones.

Parámetros	$A=b \cdot C$	$A=a+b \cdot C$
$a \pm s$	-	$5.05 \cdot 10^7 \pm 4.71 \cdot 10^5$
$b \pm s$	$9.16 \cdot 10^5 \pm 4.66 \cdot 10^5$	$5.13 \cdot 10^7 \pm 3.48 \cdot 10^5$
R	0.999	0.999
SS	$2.38 \cdot 10^{12}$	$1.04 \cdot 10^{12}$
AIC	144.50	142.35

Cuadro 3.3 Parámetros obtenidos tras el ajustado de las Ecuaciones 2.8 y 2.9 a los datos experimentales.

Los resultados obtenidos al aplicar la prueba F de Snedecor ($\alpha=0.05$) a los dos tipos de ecuaciones se detallan en el **Cuadro 3.4**. Puesto que la F tabulada es mayor que la calculada, se acepta que la ecuación que mejor ajusta los datos experimentales es la más sencilla (sin ordenada en origen). Por lo tanto, no es necesario realizar una recta de calibración en cada ensayo y las áreas se pueden calcular directamente tomando como patrón externo la solución de referencia.

Ecuaciones comparadas	$\delta_1 - \delta_2$	δ_2	F tab	F cal
2.8-2.9	1	3	10.13	3.86

Cuadro 3.4 Comparación estadística, mediante la prueba F de Snedecor, entre las rectas de calibración sin y con ordenada en origen ($\alpha = 0.05$).

La representación gráfica de la recta de calibración para la antipirina se muestra en la **Figura 3.2**. Dicha figura se acompaña de la ecuación de la recta y del coeficiente de correlación correspondiente.

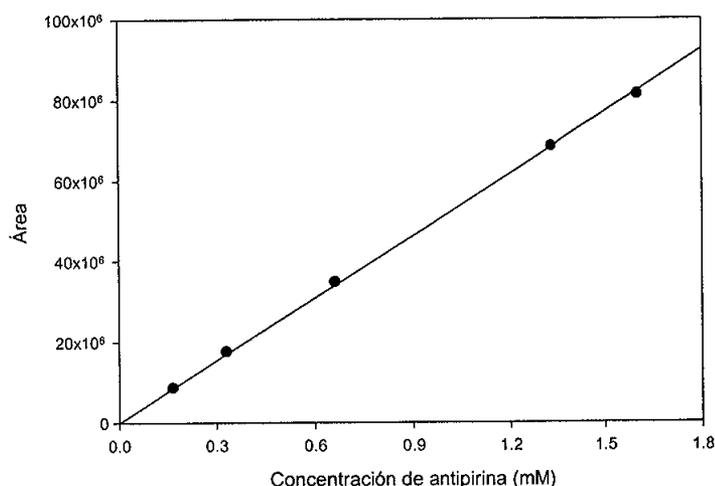


Figura 3.2 Representación gráfica de la recta de calibración obtenida para la antipirina, definida por la siguiente ecuación: $A=5.134 \cdot 10^7 \cdot C$ ($r>0,999$).

El límite de cuantificación obtenido según los valores de la recta de calibración, a partir de la expresión descrita en el *Epígrafe 2.5.3*, ha sido 0.09 mM.

En el **Cuadro 3.5** se indican las ecuaciones de la recta de calibración del salbutamol, para los ensayos "in vitro", con ordenada y sin ordenada en el origen. También se indican los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales, la suma de cuadrados (SS), el valor AIC y el coeficiente de correlación. Como puede observarse, existe una excelente linealidad entre las áreas y las concentraciones.

Los resultados obtenidos al aplicar la prueba F de Snedecor ($\alpha=0.05$) a los dos tipos de ecuaciones se detallan en el **Cuadro 3.6**. Puesto que la F tabulada es mayor que la calculada, se acepta que la ecuación que mejor ajusta los

datos experimentales es la más sencilla (sin ordenada en origen). Por lo tanto, no es necesario realizar una recta de calibración en cada ensayo y las áreas se pueden calcular directamente tomando como patrón externo la solución de referencia.

La representación gráfica de la recta de calibración para el salbutamol se muestra en la **Figura 3.3**. Dicha figura se acompaña de la ecuación de la recta y del coeficiente de correlación correspondiente.

Parámetros	$A=b \cdot C$	$A=a+b \cdot C$
$a \pm s$	-	$6.95 \cdot 10^4 \pm 2.34 \cdot 10^4$
$b \pm s$	$2.39 \cdot 10^6 \pm 2.24 \cdot 10^4$	$2.34 \cdot 10^6 \pm 2.04 \cdot 10^4$
r	0.999	0.999
SS	$8.03 \cdot 10^9$	$1.49 \cdot 10^9$
AIC	93.23	88.50

Cuadro 3.5 Parámetros obtenidos tras el ajustado de las Ecuaciones 2.8 y 2.9 a los datos experimentales.

Ecuaciones Comparadas	$\delta_1 - \delta_2$	δ_2	F tab	F cal
2.8-2.9	1	2	18.51	8.77

Cuadro 3.6 Comparación estadística, mediante la prueba F de Snedecor, entre las rectas de calibración sin y con ordenada en origen ($\alpha=0.05$).

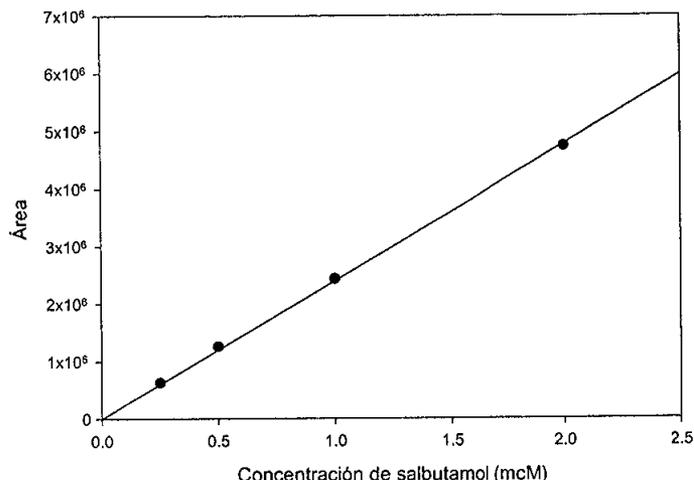


Figura 3.3 Representación gráfica de la recta de calibración obtenida para el salbutamol, definida por la siguiente ecuación: $A=2.39 \cdot 10^6 \cdot C$ ($r>0,999$).

El límite de cuantificación obtenido según los valores de la recta de calibración, a partir de la expresión descrita en el *Epígrafe 2.5.3*, ha sido 0.1 μM .

3.1.2 Ensayos de precisión y exactitud

La *precisión* del método de valoración, que indica la dispersión de los datos experimentales respecto de la media aritmética, se expresa por la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada medida y la *exactitud*, que se refiere a la similitud entre el valor teórico de la concentración de un analito en una muestra y el valor experimental estimado, se expresa mediante los errores absolutos y relativos de dichos valores. Obtener un resultado exacto es muy importante ya que implica que el método no está sujeto a error sistemático.

En los **Cuadros 3.7** a **3.17** se muestran los resultados de la validación del método analítico utilizado en la determinación del salbutamol, detallándose en cada uno de ellos la concentración de referencia. De cada concentración de referencia se hicieron tres determinaciones. La media aritmética de los tres valo-

res obtenidos representa la concentración estimada de cada dilución valorada. También se indican el valor de la desviación estándar, el coeficiente de variación y el error absoluto y relativo.

Para las soluciones de salbutamol que presentan una concentración superior a la de 0.29 mM, todas las muestras intestinales se diluyeron convenientemente para que estuvieran dentro del ámbito de concentraciones que abarcaba la curva de calibración.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
2 μ M	1.976	0.010	0.54	0.024	1.20
1 μ M	0.972	0.010	1.03	0.028	2.80
0.5 μ M	0.484	0.002	0.41	0.016	3.20

Cuadro 3.7 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 100 μ M.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
2 μ M	2.063	0.027	1.29	0.063	3.15
1 μ M	0.999	0.021	2.07	0.001	0.10
0.5 μ M	0.498	0.001	0.31	0.002	0.40

Cuadro 3.8 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 100 μ M adicionada de verapamilo 100 μ M.

Concentración referencia	Concentración Estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
2 μM	1.918	0.039	2.03	0.082	4.10
1 μM	0.981	0.016	1.67	0.019	1.90
0.5 μM	0.503	0.001	0.19	0.003	0.60

Cuadro 3.9 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 100 μM adicionada de probenecid 100 μM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
2 μM	2.013	0.017	0.84	0.013	0.65
1 μM	0.988	0.013	1.31	0.012	1.20
0.5 μM	0.496	0.009	1.81	0.004	0.80

Cuadro 3.10 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 100 μM adicionada de zumo de pomelo natural.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.199	0.006	3.02	0.001	0.50
0.15 mM	0.152	0.001	0.66	0.002	1.33
0.10 mM	0.101	0.004	0.04	0.001	1.00

Cuadro 3.11 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.198	0.002	1.01	0.002	1.00
0.15 mM	0.145	0.005	3.44	0.005	3.33
0.10 mM	0.099	0.001	1.01	0.001	1.00

Cuadro 3.12 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de verapamilo 10 mM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.203	0.002	0.99	0.003	1.50
0.15 mM	0.150	0.001	0.66	0.000	0.02
0.10 mM	0.102	0.001	0.98	0.002	2.00

Cuadro 3.13 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de verapamilo 20 mM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.206	0.002	0.97	0.006	3.00
0.15 mM	0.155	0.001	0.39	0.005	3.33
0.10 mM	0.105	0.001	0.58	0.003	3.00

Cuadro 3.14 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de azida sódica 0.3 mM.

Concentración referencia	Concentración Estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.206	0.001	0.29	0.006	3.00
0.15 mM	0.153	0.002	0.98	0.003	2.00
0.10 mM	0.102	0.002	1.47	0.002	2.00

Cuadro 3.15 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de azida sódica 3 mM.

Concentración referencia	Concentración Estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.198	0.000	0.25	0.006	1.00
0.15 mM	0.153	0.001	0.39	0.003	2.00
0.10 mM	0.099	0.001	0.61	0.002	1.00

Cuadro 3.16 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de azida sódica 6 mM.

Concentración referencia	Concentración Estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
0.20 mM	0.203	0.003	1.47	0.003	1.50
0.15 mM	0.154	0.007	4.54	0.004	2.66
0.10 mM	0.102	0.002	1.96	0.002	2.00

Cuadro 3.17 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución de salbutamol 0.29 mM adicionada de zumo de pomelo natural.

En los **Cuadros 3.18** a **3.20** se muestran los resultados de la validación del método analítico utilizado para el fármaco patrón (antipirina). Se seleccionaron cuatro concentraciones de referencia que abarcaron el ámbito de concentraciones valoradas en las muestras intestinales. Del mismo modo, se realizaron tres determinaciones de cada concentración de referencia, representando la media aritmética de las mismas y el valor de la concentración estimada para cada dilución valorada. Asimismo, se indica el valor de la desviación estándar, el coeficiente de variación y el error absoluto y relativo.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
1.330	1.328	0.005	0.40	0.002	0.15
0.660	0.649	0.002	0.36	0.011	1.66
0.330	0.333	0.001	0.30	0.003	0.91
0.165	0.162	0.001	0.91	0.003	1.81

Cuadro 3.18 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución antipirina 1.6 mM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
1.330	1.355	0.002	0.16	0.025	1.88
0.660	0.690	0.008	1.23	0.030	4.54
0.330	0.347	0.002	0.61	0.017	5.15
0.165	0.172	0.002	1.23	0.007	4.24

Cuadro 3.19 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución antipirina 1.6 mM adicionada de verapamilo 10 mM.

Concentración referencia	Concentración estimada	d.e.	CV(%)	E _a	E _r (%)
1.330	1.331	0.004	0.32	0.001	0.07
0.660	0.685	0.008	1.25	0.025	3.78
0.330	0.337	0.005	1.44	0.007	2.12
0.165	0.163	0.007	4.34	0.002	1.21

Cuadro 3.20 Resultados de los ensayos de precisión y exactitud para el método analítico, obtenidos con una solución antipirina 1.6 mM adicionada de verapamilo 20 mM.

3.2 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN

En los ensayos de degradación se ha determinado la concentración de salbutamol presente en las muestras intestinales, después de su incubación durante distintos periodos de tiempo. Los resultados obtenidos, para cuatro replicados por cada condición de ensayo (*Epígrafe 2.2.7*), se exponen en los **Cuadros 3.21 a 3.24**, junto con el valor promedio y la desviación estándar.

De los datos obtenidos se deduce que, en todos los casos, los valores medios de concentración de salbutamol difieren en menos de una unidad porcentual respecto a la solución de referencia no incubada (0.29 mM).

En los **Cuadros 3.25 a 3.28**, se muestra el resultado del ensayo estadístico (ANOVA). En todos los casos el valor p es mayor de 0.05, lo que permite establecer que no existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en los distintos tiempos de incubación. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, no existe degradación química ni microbiana del β -bloqueante.

Tiempo (min)	Animales de experimentación				Valor medio (\pm d.e.)
	1	2	3	4	
10	0.292	0.295	0.292	0.288	0.292 \pm 0.003
20	0.288	0.288	0.287	0.289	0.288 \pm 0.001
30	0.289	0.286	0.290	0.297	0.291 \pm 0.005

Cuadro 3.21 Ensayo de degradación: concentraciones (mM) de salbutamol en las muestras en función del tiempo de incubación, utilizando líquido de lavado corto como solución de perfusión. Concentración de referencia: 0.29 mM.

Tiempo (min)	Animales de experimentación				Valor medio (\pm d.e.)
	1	2	3	4	
10	0.289	0.289	0.298	0.295	0.293 \pm 0.005
20	0.291	0.295	0.289	0.290	0.291 \pm 0.002
30	0.295	0.294	0.292	0.289	0.292 \pm 0.003

Cuadro 3.22 Ensayo de degradación: concentraciones (mM) de salbutamol en las muestras en función del tiempo de incubación, utilizando líquido de lavado corto adicionado de verapamilo 20 mM como solución de perfusión. Concentración de referencia: 0.29 mM.

Tiempo (min)	Animales de experimentación				Valor medio (\pm d.e.)
	1	2	3	4	
10	0.285	0.290	0.291	0.291	0.289 \pm 0.003
20	0.281	0.291	0.289	0.291	0.288 \pm 0.005
30	0.281	0.292	0.283	0.293	0.287 \pm 0.006

Cuadro 3.23 Ensayo de degradación: concentraciones (mM) de salbutamol en las muestras en función del tiempo de incubación, utilizando líquido de lavado corto adicionado de azida sódica 6 mM como solución de perfusión. Concentración de referencia: 0.29 mM.

Tiempo (min)	Animales de experimentación				Valor medio (\pm d.e.)
	1	2	3	4	
10	0.294	0.288	0.289	0.292	0.291 \pm 0.003
20	0.292	0.291	0.293	0.293	0.292 \pm 0.001
30	0.289	0.290	0.293	0.291	0.290 \pm 0.002

Cuadro 3.24 Ensayo de degradación: concentraciones (mM) de salbutamol en las muestras en función del tiempo de incubación, utilizando líquido de lavado corto adicionado de zumo de pomelo como solución de perfusión. Concentración de referencia: 0.29 mM.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	$2.92 \cdot 10^{-5}$	2	$1.46 \cdot 10^{-5}$	1.431	0.289	NS
En los grupos	$9.17 \cdot 10^{-5}$	9	$1.02 \cdot 10^{-5}$			
TOTAL	$12.09 \cdot 10^{-5}$	11				
Prueba de Levene				$P = 0.194$		

Cuadro 3.25 Análisis de varianza de una vía correspondiente a las concentraciones de salbutamol en el ensayo de degradación realizado, utilizando líquido de lavado corto como solución de perfusión.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	$5.17 \cdot 10^{-6}$	2	$2.58 \cdot 10^{-6}$	0.227	0.801	NS
En los grupos	$1.03 \cdot 10^{-4}$	9	$1.14 \cdot 10^{-5}$			
TOTAL	$1.08 \cdot 10^{-4}$	11				
Prueba de Levene				$P = 0.142$		

Cuadro 3.26 Análisis de varianza de una vía correspondiente a los porcentajes de degradación del salbutamol en el ensayo de degradación realizado, utilizando líquido de lavado corto y verapamilo a concentración 20 mM como solución de perfusión.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	$8.17 \cdot 10^{-6}$	2	$4.08 \cdot 10^{-6}$	0.179	0.839	NS
En los grupos	$2.05 \cdot 10^{-4}$	9	$2.28 \cdot 10^{-5}$			
TOTAL	$2.14 \cdot 10^{-4}$	11				
Prueba de Levene				$P = 0.093$		

Cuadro 3.27 Análisis de varianza de una vía correspondiente a los porcentajes de degradación del salbutamol en el ensayo de degradación realizado, utilizando líquido de lavado corto y azida sódica a concentración 6 mM como solución de perfusión.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	$6.00 \cdot 10^{-6}$	2	$3.00 \cdot 10^{-6}$	0.788	0.484	NS
En los grupos	$3.43 \cdot 10^{-5}$	9	$3.81 \cdot 10^{-6}$			
TOTAL	$4.03 \cdot 10^{-5}$	11				
Prueba de Levene				$P = 0.063$		

Cuadro 3.28 Análisis de varianza de una vía correspondiente a los porcentajes de degradación del salbutamol en el ensayo de degradación realizado, utilizando líquido de lavado corto y zumo de pomelo como solución de perfusión.

3.3 ENSAYOS DE REABSORCIÓN DE AGUA

La reabsorción de agua se ha evaluado a partir de los volúmenes remanentes obtenidos experimentalmente a tiempo cero y a 30 minutos (*Epigrafe 2.2.6*).

Las soluciones de perfusión ensayadas se han perfundido, aleatoriamente, en cinco animales de experimentación. De este modo se ha obtenido el valor medio representativo del volumen remanente en lumen intestinal a tiempo cero.

medio representativo del volumen remanente en lumen intestinal a tiempo cero. En los **Cuadros 3.29** y **3.30**, se consignan los valores individuales y el valor medio, este último acompañado de la desviación estándar, así como del coeficiente de variación.

Al finalizar el ensayo de absorción, los volúmenes remanentes a 30' se han determinado de forma individual para cada animal de experimentación, tal como se indica en el *Epígrafe 2.2.6*. Los valores individuales y medios, acompañados de su desviación estándar, se indican en los **Cuadros 3.31 a 3.37**, **Cuadros 3.39** y **3.40**, **Cuadros 3.44 a 3.46**, **Cuadro 3.50**, **Cuadros 3.52 a 3.54**, **Cuadros 3.58 a 3.61**, **Cuadro 3.63** y **Cuadro 3.64**.

	Animales de experimentación					Media±d.e.	CV(%)
	1	2	3	4	5		
V ₀ (mL)	10.50	10.32	10.43	10.66	10.90	10.56±0.23	2.14

Cuadro 3.29 Valores individuales y valor medio de los volúmenes remanentes (mL) a tiempo cero, después de la perfusión de las soluciones de salbutamol seleccionadas, en intestino delgado completo.

	Animales de experimentación					Media±d.e.	CV(%)
	1	2	3	4	5		
V ₀ (mL)	5.10	5.05	5.20	5.10	5.15	5.12±0.06	1.11

Cuadro 3.30 Valores individuales y valor medio de los volúmenes remanentes (mL) a tiempo cero, después de la perfusión de las soluciones de salbutamol seleccionadas, en diferentes tramos intestinales.

3.4 ENSAYOS DE ABSORCIÓN *IN SITU*

3.4.1 Absorción del salbutamol en intestino delgado de rata

3.4.1.1 *Salbutamol a concentraciones crecientes*

Las concentraciones remanentes de salbutamol halladas para cada tiempo de muestreo y corregidas para la reabsorción de agua, después de la perfusión en el intestino completo de rata de las soluciones del citado fármaco a concentraciones crecientes, han sido, en nuestras condiciones experimentales, las que se exponen en los **Cuadros 3.31 a 3.37**. Se indican los valores de las concentraciones individuales, así como el valor medio con su correspondiente desviación estándar. También se detallan los volúmenes remanentes a los 30 minutos, las constantes aparentes de velocidad de absorción, k_a , obtenidas por regresión no lineal de las concentraciones remanentes medidas frente a los tiempos de muestreo y las constantes promedias con su desviación estándar. El ensayo de absorción se realizó empleando lotes de 8 animales para cada una de las soluciones ensayadas.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.109	0.095	0.099	0.112	0.114	0.111	0.101	0.104	0.106±0.006
10	0.107	0.094	0.098	0.109	0.112	0.108	0.099	0.101	0.104±0.006
15	0.104	0.092	0.095	0.106	0.108	0.105	0.096	0.099	0.101±0.006
20	0.102	0.091	0.094	0.105	0.106	0.102	0.095	0.096	0.099±0.006
25	0.100	0.088	0.090	0.102	0.103	0.100	0.093	0.094	0.096±0.006
30	0.098	0.087	0.088	0.099	0.100	0.097	0.091	0.092	0.094±0.006
V_r (mL)	8.50	8.30	8.28	8.20	8.20	8.30	8.50	8.30	8.32±0.12
k_a (h ⁻¹)	0.277	0.220	0.291	0.290	0.317	0.320	0.247	0.295	0.295
A_0 (mM)	0.112	0.097	0.102	0.114	0.117	0.114	0.103	0.106	0.109
r (>)	0.996	0.986	0.984	0.994	0.996	0.999	0.995	0.998	0.998
k_a promedio = (0.282±0.033) h⁻¹									

Cuadro 3.31 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.15 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.218	0.227	0.198	0.224	0.216	0.229	0.235	0.229	0.222±0.011
10	0.212	0.219	0.193	0.214	0.210	0.222	0.224	0.218	0.214±0.010
15	0.206	0.210	0.184	0.208	0.199	0.215	0.218	0.208	0.206±0.011
20	0.200	0.205	0.179	0.199	0.195	0.210	0.214	0.198	0.200±0.011
25	0.194	0.195	0.173	0.191	0.187	0.201	0.206	0.197	0.193±0.010
30	0.188	0.189	0.166	0.183	0.181	0.196	0.199	0.186	0.186±0.010
V_r (mL)	7.20	7.20	7.87	8.60	7.86	7.86	9.20	8.20	8.00±0.67
k_a (h ⁻¹)	0.354	0.441	0.423	0.477	0.430	0.377	0.378	0.482	0.420
A_0 (mM)	0.225	0.236	0.206	0.233	0.224	0.236	0.241	0.237	0.230
r (>)	0.999	0.998	0.997	0.999	0.996	0.998	0.993	0.998	0.999
k_a promedia = (0.420±0.047) h⁻¹									

Cuadro 3.32 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución libre de salbutamol a una concentración 0.29 mM. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	1.063	0.923	0.903	0.986	0.870	0.727	0.860	0.910	0.905±0.098
10	1.016	0.868	0.874	0.933	0.828	0.695	0.826	0.908	0.868±0.093
15	0.967	0.828	0.826	0.899	0.779	0.662	0.773	0.843	0.822±0.090
20	0.927	0.782	0.784	0.866	0.763	0.630	0.743	0.792	0.786±0.087
25	0.885	0.741	0.749	0.805	0.719	0.607	0.713	0.784	0.750±0.080
30	0.845	0.702	0.714	0.775	0.675	0.581	0.677	0.731	0.712±0.077
V_r (mL)	8.30	7.80	7.30	7.30	8.00	7.10	7.68	7.00	7.56±0.46
k_a (h^{-1})	0.550	0.654	0.578	0.575	0.585	0.543	0.578	0.544	0.576
A_0 (mM)	1.112	0.972	0.953	1.034	0.913	0.759	0.903	0.968	0.952
r (>)	0.999	0.999	0.998	0.995	0.994	0.999	0.997	0.988	0.999
k_a promedio = (0.576±0.035) h^{-1}									

Cuadro 3.33 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **1.20 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	3.690	4.022	3.990	3.570	3.800	3.660	3.890	3.800	3.803±0.159
10	3.570	3.780	3.800	3.370	3.610	3.464	3.680	3.640	3.614±0.147
15	3.370	3.630	3.610	3.160	3.440	3.290	3.487	3.370	3.419±0.158
20	3.190	3.450	3.430	3.050	3.215	3.143	3.321	3.210	3.251±0.139
25	3.019	3.290	3.230	2.840	3.050	2.950	3.138	3.060	3.072±0.146
30	2.880	3.130	3.120	2.730	2.840	2.810	2.964	2.920	2.924±0.142
V_r (mL)	7.41	7.80	7.35	7.00	7.10	7.41	7.40	7.50	7.37±0.24
k_a (h ⁻¹)	0.612	0.592	0.606	0.654	0.690	0.636	0.648	0.654	0.635
A_0 (mM)	3.915	4.204	4.199	3.756	4.047	3.857	4.103	4.013	4.012
r (>)	0.998	0.999	0.999	0.997	0.998	0.999	0.999	0.996	0.999
k_a promedia = (0.636±0.032) h⁻¹									

Cuadro 3.34 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **5 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	6.268	6.690	6.945	6.729	5.876	6.190	6.258	7.296	6.531±0.464
10	5.907	6.280	6.514	6.580	5.604	5.870	5.898	7.045	6.212±0.478
15	5.537	5.890	6.124	6.182	5.434	5.591	5.540	6.585	5.860±0.407
20	5.301	5.510	5.750	5.723	5.049	5.314	5.275	6.117	5.505±0.342
25	4.693	5.210	5.400	5.317	4.898	4.983	4.758	5.823	5.135±0.377
30	4.562	4.860	5.070	5.065	4.703	4.767	4.694	5.796	4.939±0.389
V_r (mL)	7.30	8.15	7.30	8.65	7.56	7.45	7.00	8.00	7.67±0.55
k_a (h ⁻¹)	0.792	0.726	0.756	0.720	0.546	0.630	0.732	0.624	0.696
A_0 (mM)	6.730	7.001	7.392	7.285	6.151	6.531	6.655	7.700	6.946
r (>)	0.991	0.989	0.999	0.989	0.994	0.999	0.992	0.983	0.998
k_a promedio = (0.690±0.082) h⁻¹									

Cuadro 3.35 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **9 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	10.500	9.458	10.536	9.480	9.853	9.365	10.200	10.729	10.015±0.547
10	10.026	9.080	10.148	9.130	9.503	8.789	9.814	10.260	9.594±0.550
15	9.580	8.732	9.595	8.570	9.011	8.343	9.150	9.474	9.057±0.478
20	9.154	8.312	9.218	8.219	8.702	7.859	8.638	8.963	8.633±0.455
25	8.732	7.842	8.811	7.786	8.223	7.518	8.107	8.358	8.172±0.455
30	8.340	7.486	8.415	7.416	7.905	7.192	7.673	7.907	7.792±0.435
V_r (mL)	7.95	7.68	8.00	7.80	7.85	8.20	7.00	7.40	7.735±0.379
k_a (h ⁻¹)	0.552	0.564	0.544	0.600	0.537	0.642	0.702	0.750	0.612
A_0 (mM)	10.996	9.969	11.047	10.005	10.339	9.815	10.902	11.492	10.571
r (>)	0.999	0.998	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999
k_a promedio = (0.611±0.079) h⁻¹									

Cuadro 3.36 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **13 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	13.340	11.710	13.380	13.480	13.740	13.300	14.352	14.478	13.472±0.847
10	12.500	11.040	12.780	13.050	13.120	12.600	13.667	14.141	12.861±0.919
15	12.240	10.500	12.130	12.080	12.140	12.100	12.844	13.291	12.165±0.803
20	11.810	9.900	11.440	11.560	11.320	11.300	12.263	12.798	11.549±0.844
25	10.890	9.660	10.810	11.130	11.070	10.800	12.227	11.654	11.030±0.739
30	10.150	9.060	10.280	10.700	10.280	10.100	10.597	11.275	10.305±0.632
V_r (mL)	7.42	7.89	8.10	7.55	8.00	8.23	7.65	8.00	7.85±0.28
k_a (h ⁻¹)	0.612	0.600	0.642	0.579	0.702	0.648	0.636	0.630	0.635
A_0 (mM)	14.072	12.242	14.175	14.163	14.579	14.081	15.184	15.495	14.260
r (>)	0.983	0.996	0.999	0.992	0.993	0.998	0.967	0.997	0.999
k_a promedia = (0.631±0.037) h⁻¹									

Cuadro 3.37 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **18 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

Los resultados obtenidos al realizar una prueba no paramétrica de comparación múltiple (Dunnett T3) con las constantes de velocidad de absorción obtenidas con las soluciones de salbutamol 0.15, 0.29, 1.2, 5, 9, 13 y 18 mM se consignan en el **Cuadro 3.38** . Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró que las varianzas no son homogéneas ($p = 0.003$).

PRUEBA de DUNNETT T3							
Salbutamol (mM)	0.15	0.29	1.2	5	9	13	18
0.15	-						
0.29	S	-					
1.20	S	S	-				
5	S	S	NS	-			
9	S	S	NS	NS	-		
13	S	S	NS	NS	NS	-	
18	S	S	NS	NS	NS	NS	-

Cuadro 3.38 Resultados de la prueba de Dunnett T3 realizada con las constantes de velocidad del salbutamol obtenidas tras la perfusión de soluciones crecientes de fármaco.

3.4.1.2 Influencia de diferentes modificadores de la absorción del salbutamol

3.4.1.2.1 Verapamilo

En los **Cuadros 3.39** y **3.40** se recogen las concentraciones remanentes obtenidas a los diferentes tiempos de toma de muestra y corregidas para la reabsorción de agua, del salbutamol 0.29 mM, en presencia de verapamilo a dos concentraciones crecientes: 10 y 20 mM, respectivamente.

Se indican, asimismo, los valores medios con la correspondiente desviación estándar. También se detallan los volúmenes remanentes a los 30 minutos, las constantes aparentes de velocidad de absorción, k_a , obtenidas por regresión no lineal de las concentraciones remanentes medidas frente a los tiempos de muestreo y las constantes promedias con la desviación estándar. El ensayo de absorción se realizó empleando lotes de 8 animales para cada una de las soluciones ensayadas.

En el **Cuadro 3.41** se resumen los valores k_a promedios ($n=8$) cuando la concentración de verapamilo utilizada es 0, 10 y 20 mM. Estos valores se acompañan de la desviación estándar.

En el **Cuadro 3.42**, se indica el resultado del análisis de varianza de una vía (ANOVA) realizado para comparar las constantes de absorción aparentes del salbutamol obtenidas en las condiciones experimentales especificadas. Previamente se aplicó la prueba de Levene, que demostró la homogeneidad de las varianzas ($p = 0.179$).

En el **Cuadro 3.43** se muestran los resultados obtenidos al aplicar una comparación múltiple, la prueba de Scheffe, a las constantes de absorción obtenidas para el salbutamol 0.29 mM en ausencia y en presencia de verapamilo a la concentración 10 mM o 20 mM. Como puede observarse, se han detectado diferencias significativas entre los tres grupos de valores.

Por último, en la **Figura 3.4** se muestra el efecto del verapamilo sobre la constante de absorción aparente del salbutamol.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.213	0.231	0.195	0.204	0.234	0.212	0.205	0.209	0.213±0.013
10	0.196	0.208	0.183	0.188	0.217	0.194	0.184	0.194	0.195±0.012
15	0.180	0.199	0.163	0.175	0.201	0.183	0.166	0.183	0.181±0.014
20	0.165	0.177	0.154	0.162	0.189	0.170	0.154	0.166	0.167±0.012
25	0.147	0.165	0.143	0.148	0.173	0.158	0.142	0.150	0.153±0.011
30	0.136	0.146	0.131	0.137	0.160	0.142	0.128	0.144	0.140±0.010
V_r (mL)	7.50	7.40	7.85	7.45	7.57	7.80	7.64	7.33	7.57±0.19
k_a (h ⁻¹)	1.086	1.051	0.954	0.948	0.902	0.923	1.111	0.932	0.993
A_0 (mM)	0.234	0.252	0.212	0.221	0.252	0.230	0.223	0.226	0.232
r (>)	0.999	0.994	0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	0.998	0.999
k_a promedio = (0.988±0.081) h⁻¹									

Cuadro 3.39 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **verapamilo 10 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.212	0.220	0.212	0.211	0.206	0.208	0.215	0.208	0.211±0.004
10	0.195	0.196	0.193	0.191	0.189	0.190	0.195	0.181	0.191±0.005
15	0.176	0.175	0.173	0.172	0.166	0.172	0.177	0.167	0.172±0.004
20	0.154	0.152	0.157	0.155	0.158	0.158	0.162	0.153	0.156±0.003
25	0.137	0.143	0.140	0.140	0.135	0.142	0.144	0.138	0.139±0.003
30	0.124	0.125	0.128	0.127	0.129	0.126	0.136	0.124	0.127±0.004
V_r (mL)	7.15	7.15	7.60	8.20	7.14	7.45	7.25	7.25	7.40±0.36
k_a (h ⁻¹)	1.312	1.350	1.228	1.227	1.170	1.173	1.136	1.205	1.231
A_0 (mM)	0.239	0.245	0.235	0.234	0.227	0.230	0.236	0.227	0.234
r (>)	0.998	0.998	0.999	0.999	0.993	0.998	0.998	0.999	0.999
k_a promedia = (1.225±0.073) h⁻¹									

Cuadro 3.40 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **verapamilo 20 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

Concentración de Verapamilo (mM)	N	$K_a(h^{-1})$ del salbutamol \pm d.e
0	8	0.420 ± 0.047
10	8	0.988 ± 0.081
20	8	1.225 ± 0.073

Cuadro 3.41 Valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en intestino delgado de la rata al perfundir salbutamol 0.29 mM, sin y con verapamilo 10 y 20 mM, respectivamente.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	2.738	2	1.369	290.12	0.000	S
En los grupos	$9.90 \cdot 10^{-2}$	21	$4.72 \cdot 10^{-3}$			
TOTAL	2.837	23				
Prueba de Levene				$P = 0.179$		

Cuadro 3.42 Análisis de varianza de una vía correspondiente a las constantes de absorción aparentes del salbutamol tras perfundir en el intestino delgado de la rata las soluciones de salbutamol 0.29 mM, salbutamol 0.29 mM adicionada de verapamilo 10 mM y salbutamol 0.29 mM adicionada de verapamilo 20 mM.

PRUEBA de SCHEFFE			
Verapamilo (mM)	0	10	20
0	-		
10	S	-	
20	S	S	-

Cuadro 3.43 Resultados de la prueba de Scheffe realizada con las constantes de velocidad de absorción del salbutamol, obtenidas tras la perfusión de salbutamol 0.29 mM, en ausencia y en presencia de verapamilo a dos concentraciones diferentes, 10 y 20 mM.

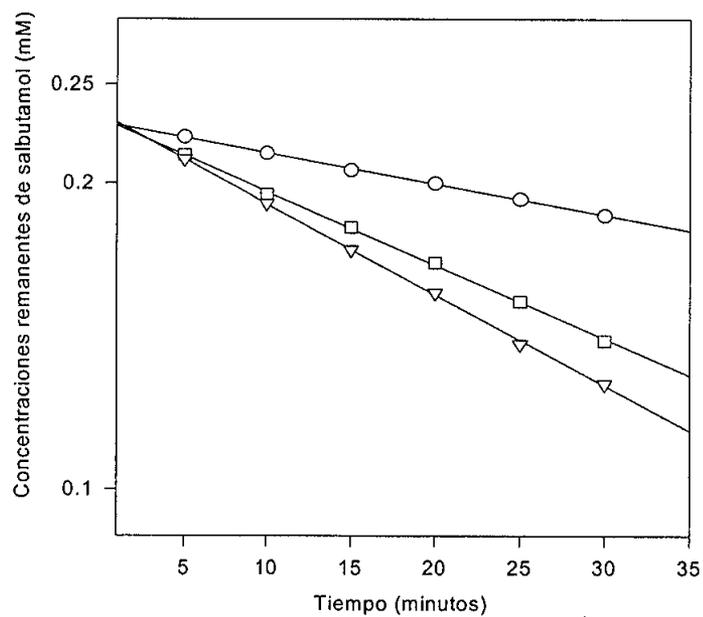


Figura 3.4 Representación gráfica de las concentraciones remanentes medias de salbutamol frente a los tiempos de toma de muestra, después de perfundir las soluciones de salbutamol 0.29 mM solo (○) y en presencia de verapamilo 10 mM (□) y 20 mM (▽), respectivamente.

3.4.1.2.2 Azida sódica

En los **Cuadros 3.44 a 3.46** se recogen, para las soluciones de salbutamol 0.29 mM en presencia de azida sódica a concentraciones 0.3, 3 y 6 mM, las concentraciones remanentes individuales en intestino delgado a los diferentes tiempos de toma de muestra, corregidas para la reabsorción de agua. También se indican las concentraciones medias con la desviación estándar. Aparecen los volúmenes remanentes obtenidos a tiempo 30', así como su media y desviación estándar. Asimismo, se consignan las constantes de absorción aparentes (k_a) individuales, medias y promedias. También se indican, en cada caso, las ordenadas en origen y los coeficientes de correlación

En el **Cuadro 3.47** se resumen los valores de k_a promedios obtenidos para las condiciones de ensayo citadas.

En el **Cuadro 3.48** se indican los resultados del análisis de varianza de una vía realizado con las constantes de absorción aparentes del salbutamol obtenidas en presencia de cada una de las tres concentraciones de azida sódica ensayadas. Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró la homogeneidad de las varianzas ($p = 0.185$).

En el **Cuadro 3.49** se muestran los resultados obtenidos al realizar la comparación múltiple mediante la prueba de Scheffe.

En la **Figura 3.5**, se muestra el efecto de la azida sódica 6 mM en la constante de velocidad aparente del salbutamol 0.29 mM.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.235	0.230	0.230	0.236	0.237	0.265	0.238	0.242	0.239±0.011
10	0.222	0.222	0.220	0.224	0.228	0.251	0.226	0.233	0.228±0.010
15	0.208	0.216	0.210	0.214	0.215	0.237	0.215	0.220	0.217±0.009
20	0.203	0.202	0.200	0.202	0.205	0.229	0.204	0.210	0.207±0.009
25	0.190	0.194	0.190	0.192	0.193	0.218	0.194	0.200	0.196±0.009
30	0.182	0.184	0.181	0.183	0.185	0.209	0.185	0.191	0.187±0.009
V_r (mL)	8.30	8.50	8.50	8.20	8.51	8.20	8.21	8.70	8.39±0.19
k_a (h ⁻¹)	0.612	0.538	0.578	0.618	0.612	0.568	0.606	0.578	0.592
A_0 (mM)	0.246	0.243	0.248	0.248	0.251	0.276	0.250	0.255	0.251
R (>)	0.995	0.993	0.999	0.999	0.998	0.997	0.999	0.999	0.999
k_a promedia = (0.589±0.030) h⁻¹									

Cuadro 3.44 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **azida sódica 0.3 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.231	0.203	0.216	0.221	0.216	0.234	0.223	0.200	0.218±0.012
10	0.220	0.197	0.200	0.210	0.206	0.225	0.213	0.192	0.208±0.011
15	0.206	0.181	0.195	0.199	0.198	0.213	0.200	0.185	0.197±0.010
20	0.196	0.176	0.183	0.189	0.187	0.204	0.190	0.177	0.187±0.009
25	0.182	0.163	0.173	0.180	0.179	0.194	0.182	0.167	0.177±0.010
30	0.173	0.156	0.165	0.170	0.171	0.185	0.172	0.160	0.169±0.009
V _r (mL)	8.90	7.90	8.60	8.15	7.70	8.30	8.00	8.50	8.26±0.39
k _a (h ⁻¹)	0.708	0.654	0.636	0.624	0.564	0.567	0.624	0.537	0.620
A ₀ (mM)	0.246	0.216	0.226	0.233	0.226	0.246	0.235	0.210	0.229
r (>)	0.999	0.992	0.995	0.999	0.999	0.999	0.999	0.997	0.999
k_a promedio = (0.615±0.055) h⁻¹									

Cuadro 3.45 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **azida sódica 3 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A₀) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.229	0.224	0.220	0.231	0.215	0.210	0.220	0.201	0.219±0.010
10	0.217	0.213	0.213	0.218	0.203	0.204	0.209	0.192	0.209±0.009
15	0.203	0.204	0.200	0.205	0.194	0.191	0.198	0.181	0.197±0.008
20	0.191	0.194	0.190	0.192	0.180	0.181	0.186	0.172	0.187±0.009
25	0.179	0.188	0.182	0.185	0.175	0.175	0.177	0.164	0.178±0.007
30	0.169	0.173	0.170	0.174	0.166	0.165	0.165	0.156	0.167±0.006
V _r (mL)	8.45	8.25	7.74	7.70	8.40	8.20	8.00	8.20	8.26±0.39
k _a (h ⁻¹)	0.738	0.583	0.654	0.684	0.624	0.588	0.684	0.618	0.648
A ₀ (mM)	0.243	0.236	0.236	0.238	0.226	0.222	0.234	0.212	0.232
r (>)	0.999	0.994	0.999	0.998	0.995	0.995	0.999	0.999	0.999
k_a promedia = (0.646±0.053) h⁻¹									

Cuadro 3.46 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **azida sódica 6 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A₀) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

Concentración de Azida sódica (mM)	N	$K_a(h^{-1})$ del salbutamol \pm d.e
0	8	0.420 \pm 0.047
0.3	8	0.589 \pm 0.030
3	8	0.615 \pm 0.055
6	8	0.646 \pm 0.053

Cuadro 3.47 Valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en intestino delgado de la rata al perfundir salbutamol 0.29 mM sin y con azida sódica 0.3, 3 y 6 mM, respectivamente.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	0.211	2	$7.03 \cdot 10^{-2}$	39.639	0.000	S
En los grupos	$4.97 \cdot 10^{-2}$	28	$1.77 \cdot 10^{-3}$			
TOTAL	0.261	31				
Prueba de Levene				$P = 0.185$		

Cuadro 3.48 Análisis de varianza de una vía correspondiente a las constantes de absorción aparentes del salbutamol después de perfundir en el intestino delgado de la rata soluciones de salbutamol 0.29 mM, salbutamol 0.29 mM junto con azida sódica 0.3 mM, salbutamol 0.29 mM junto con azida sódica 3 mM y salbutamol 0.29 mM junto con azida sódica 6 mM.

PRUEBA de SCHEFFE				
Azida sódica (mM)	0	0.3	3	6
0	-			
0.3	S	-		
3	S	NS	-	
6	S	NS	NS	-

Cuadro 3.49 Resultados de la prueba de Scheffe realizada con las constantes de velocidad de absorción del salbutamol, obtenidas después de la perfusión de salbutamol 0.29 mM, en ausencia y en presencia de azida sódica a tres concentraciones: 0.3, 3 y 6 mM.

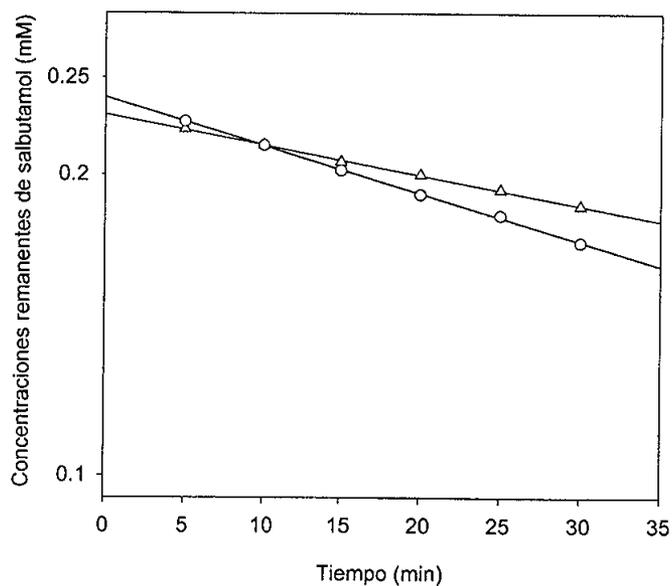


Figura 3.5 Representación gráfica de las concentraciones remanentes medias de salbutamol frente a los tiempos de muestreo, después de perfundir las soluciones de salbutamol 0.29 mM solo (Δ) y en presencia de azida sódica 6 mM (O).

3.4.1.2.3 Zumo natural de pomelo

En el **Cuadro 3.50** se recogen, para las soluciones de salbutamol 0.29 mM en presencia de zumo natural de pomelo al 50%(V/V), las concentraciones remanentes individuales a los diferentes tiempos de toma de muestra, corregidas para la reabsorción de agua. También se indican las concentraciones medias con la desviación estándar. Aparecen los volúmenes remanentes obtenidos a tiempo 30', así como su media y desviación estándar. Asimismo, se consignan las constantes de absorción aparentes (k_a) individuales, medias y promedias. También se indican, en cada caso, las ordenadas en origen y los coeficientes de correlación (r).

En el **Cuadro 3.51** se indican los resultados del análisis de varianza de una vía realizado con las constantes de absorción aparentes del salbutamol obtenidas en ausencia y en presencia de zumo de pomelo. La prueba de Levene demostró la homogeneidad de las varianzas ($p = 0.72$).

En la **Figura 3.6**, se muestra el efecto del zumo natural de pomelo en la constante de velocidad aparente del salbutamol 0.29 mM.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.210	0.208	0.200	0.224	0.212	0.213	0.200	0.226	0.212±0.009
10	0.197	0.193	0.190	0.212	0.198	0.201	0.189	0.215	0.199±0.009
15	0.189	0.180	0.181	0.202	0.187	0.192	0.179	0.204	0.189±0.009
20	0.173	0.170	0.173	0.190	0.174	0.184	0.169	0.193	0.178±0.009
25	0.162	0.158	0.164	0.180	0.164	0.172	0.161	0.185	0.168±0.009
30	0.156	0.152	0.156	0.171	0.153	0.167	0.152	0.174	0.160±0.090
V _r (mL)	8.20	7.70	6.70	7.90	8.10	7.90	7.88	7.5	7.74±0.47
k _a (h ⁻¹)	0.744	0.774	0.592	0.654	0.774	0.585	0.654	0.624	0.677
A ₀ (mM)	0.224	0.220	0.210	0.237	0.226	0.222	0.211	0.234	0.223
r (>)	0.995	0.997	0.999	0.999	0.999	0.997	0.999	0.999	0.999
k_a promedia = (0.675±0.078) h⁻¹									

Cuadro 3.50 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de **zumo natural de pomelo** en proporción volumétrica 50% (V/V). En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A₀) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	0.263	1	0.263	64.126	0.000	S
En los grupos	$5.73 \cdot 10^{-2}$	14	$4.096 \cdot 10^{-3}$			
TOTAL	0.320	15				

Prueba de Levene $P = 0.72$

Cuadro 3.51 Análisis de varianza de una vía correspondiente a las constantes de absorción aparentes del salbutamol después de perfundir en el intestino delgado de la rata las soluciones salbutamol 0.29 mM y salbutamol 0.29 mM junto con zumo natural de pomelo al 50% (V/V).

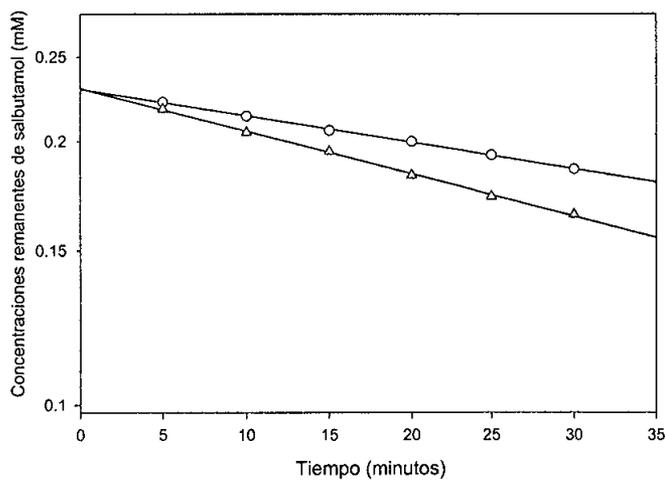


Figura 3.6 Representación gráfica de las concentraciones remanentes medias de salbutamol frente a los tiempos de toma de muestra, después de perfundir las soluciones de salbutamol 0.29 mM solo (○) y en presencia de zumo natural de pomelo al 50% (V/V)(Δ), respectivamente.

3.4.1.3 Influencia del verapamilo sobre la integridad de la membrana absorbente

Se han realizado una serie de ensayos con el fin de dilucidar si el verapamilo modifica la permeabilidad de la membrana absorbente y/o el flujo sanguíneo o bien resultaba inocuo. Como sustancia patrón se ha utilizado la antipirina.

En los **Cuadros 3.52 a 3.54** se recogen, para las soluciones de antipirina 1.33 mM en ausencia y en presencia de verapamilo 10 y 20 mM, las concentraciones remanentes individuales en intestino delgado a los diferentes tiempos de toma de muestra, corregidas para la reabsorción de agua. También se indican las concentraciones medias con la desviación estándar. Aparecen los volúmenes remanentes obtenidos a tiempo 30', así como su media y desviación estándar. Asimismo, se consignan las constantes de absorción aparentes (k_a) individuales, medias y promedias. También se indican, en cada caso, las ordenadas en origen y los coeficientes de correlación (r).

En el **Cuadro 3.55** se resumen los valores k_a promedios obtenidos para las citadas soluciones.

En el **Cuadro 3.56** se indican los resultados del análisis de varianza de una vía realizado para comparar las constantes de absorción aparentes de la antipirina en presencia de verapamilo 10 y 20 mM. Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró la homogeneidad de las varianzas ($p=0.53$).

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.776	0.744	0.776	0.696	0.638	0.701	0.786	0.744	0.733±0.051
10	0.616	0.627	0.595	0.558	0.489	0.558	0.606	0.660	0.579±0.043
15	0.473	0.478	0.452	0.446	0.377	0.441	0.499	0.494	0.457±0.040
20	0.361	0.367	0.324	0.361	0.276	0.340	0.393	0.327	0.351±0.037
25	0.292	0.297	0.266	0.287	0.212	0.276	0.308	0.303	0.282±0.032
30	0.223	0.234	0.197	0.228	0.165	0.212	0.244	0.239	0.218±0.026
V_r (mL)	8.30	8.20	8.20	8.70	8.10	8.40	8.20	8.50	8.32±0.19
k_a (h ⁻¹)	2.994	2.796	3.318	2.658	3.276	2.844	2.778	2.688	2.913
A_0 (mM)	0.999	0.956	1.026	0.866	0.839	0.893	0.983	0.935	0.940
r (>)	0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.997	0.999
k_a promedia = (2.919±0.254) h⁻¹									

Cuadro 3.52 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **antipirina** a una concentración **1.33 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (\pm d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.717	0.749	0.802	0.712	0.701	0.813	0.781	0.717	0.749 \pm 0.043
10	0.589	0.611	0.659	0.558	0.547	0.638	0.643	0.584	0.606 \pm 0.043
15	0.446	0.494	0.510	0.436	0.446	0.494	0.462	0.467	0.473 \pm 0.032
20	0.340	0.409	0.401	0.340	0.351	0.361	0.414	0.383	0.377 \pm 0.032
25	0.266	0.329	0.335	0.266	0.287	0.255	0.340	0.308	0.297 \pm 0.032
30	0.207	0.271	0.271	0.207	0.218	0.196	0.276	0.239	0.234 \pm 0.032
V_r (mL)	8.50	8.50	7.70	7.50	8.20	7.60	8.40	8.60	8.12 \pm 0.45
k_a (h ⁻¹)	3.042	2.448	2.637	2.985	2.752	3.477	2.489	2.610	2.805
A_0 (mM)	0.935	0.919	1.004	0.914	0.877	1.089	0.962	0.893	0.956
r (>)	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999
k_a promedia = (2.805\pm0.345) h⁻¹									

Cuadro 3.53 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **antipirina** a una concentración **1.33 mM** adicionada de **verapamilo 10 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL (mM)									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.691	0.738	0.691	0.877	0.924	0.813	0.691	0.770	0.776±0.090
10	0.542	0.579	0.558	0.691	0.744	0.659	0.553	0.654	0.622±0.074
15	0.430	0.457	0.446	0.547	0.611	0.521	0.425	0.515	0.494±0.064
20	0.340	0.361	0.356	0.446	0.499	0.430	0.345	0.425	0.398±0.058
25	0.271	0.282	0.287	0.340	0.404	0.335	0.266	0.351	0.313±0.048
30	0.212	0.228	0.234	0.276	0.329	0.276	0.207	0.287	0.255±0.043
V_r (mL)	8.60	8.00	7.70	7.50	7.80	7.30	7.80	8.00	7.84±0.39
k_a (h ⁻¹)	2.814	2.814	2.628	2.778	2.472	2.616	2.862	2.394	2.685
A_0 (mM)	0.871	0.924	0.861	1.099	1.132	1.009	0.882	0.951	0.972
r (>)	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
k_a promedia = (2.672±0.173) h⁻¹									

Cuadro 3.54 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **antipirina** a una concentración **1.33 mM** adicionada de **verapamilo 20 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

Concentración de Verapamilo (mM)	N	$K_a(h^{-1})$ de la antipirina \pm d.e
0	8	2.919 ± 0.254
10	8	2.805 ± 0.345
20	8	2.672 ± 0.173

Cuadro 3.55 Valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en intestino delgado de la rata después de perfundir antipirina 1.33 mM sola y con verapamilo 10 y 20 mM, respectivamente.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADO MEDIO	F	P	Sig.
Entre grupos	0.386	2	0.193	2.93	0.075	NS
En los grupos	1.383	21	$6.59 \cdot 10^{-2}$			
TOTAL	1.769	23				
Prueba de Levene				$P = 0.530$		

Cuadro 3.56 Análisis de varianza de una vía correspondiente a las constantes de absorción aparentes de la antipirina después de perfundir en el intestino delgado de la rata las soluciones de antipirina 1.33 mM, antipirina 1.33 mM junto con verapamilo 10 mM y antipirina 1.33 mM junto con verapamilo 20 mM.

3.4.1.4 Cinética de la incorporación del salbutamol

Puesto que al aumentar la concentración de salbutamol en la solución de perfusión, el valor de las constantes aumenta hasta llegar, al menos en apariencia, a un valor asintótico, se pensó en la posible combinación de dos procesos opuestos en la incorporación del fármaco al organismo, uno de entrada pasivo y otro de salida mediado por portadores susceptibles de sufrir procesos de inhibición. Para comprobar esta hipótesis se ajustaron las ecuaciones diferenciales descritas en el *Epígrafe 2.6* mediante el programa informático Winnonlin 1.0. Como factor de ponderación se ha utilizado $1/A_{teor}^2$ y como algoritmo se ha seleccionado el de Gauss-Newton (Levenberg y Hartley). Los parámetros cinéticos obtenidos se exponen en el **Cuadro 3.57**. Se detallan, asimismo, los valores de desviación estándar, AIC, suma de cuadrados y coeficiente de correlación entre los valores experimentales y los estimados por el modelo.

En las **Figuras 3.7 a 3.19** se muestran las representaciones gráficas del ajustado de las concentraciones remanentes individuales en lumen del intestino delgado frente al tiempo de toma de muestra, para todas las soluciones de perfusión utilizadas.

Parámetros	Valores estimados	Error estándar	Coefficiente de variación (%)
$k_a(h^{-1})$	1.463	0.003	11.89
$Vm_s(mM/h)$	66.90	0.501	44.96
$Km_s(mM)$	70.11	21.75	31.02
FA_0	0.787	0.005	0.59
FAE	0.855	0.012	1.44
$Km_i(mM)$	10.510	4.665	44.38
$IC_{50}(mM)$	0.270	0.679	253.38
PKM	1.30	0.091	6.96
$k_0(mM/h)$	0.45	0.003	43.47
SC	2.342		
AIC	549.022		
r	0.997		

Cuadro 3.57 Parámetros que definen la cinética de absorción y secreción intestinal del salbutamol, determinados tras el ajustado de las ecuaciones diferenciales reseñadas en el Epígrafe 2.6 a los datos experimentales obtenidos en intestino delgado de la rata. Se indican también los valores de los parámetros estadísticos determinados.

A continuación se muestran las representaciones gráficas del ajustado realizado para cada condición de ensayo

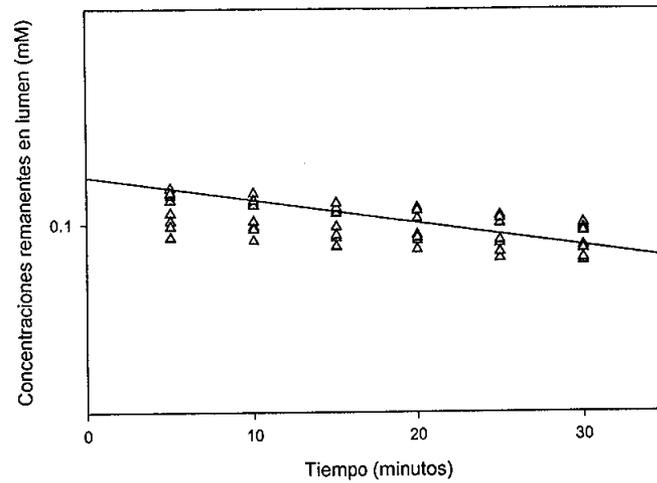


Figura 3.7 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.15 mM.

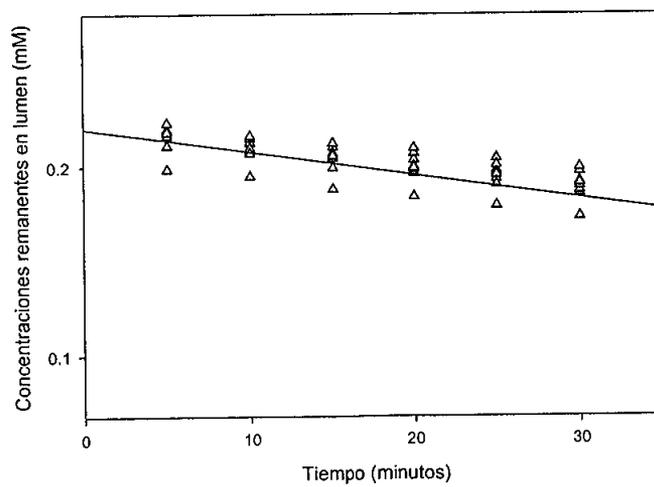


Figura 3.8 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM.

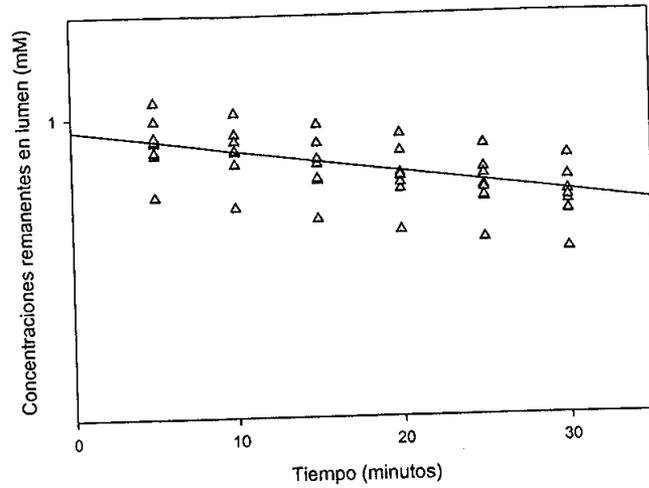


Figura 3.9 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 1.2 mM.

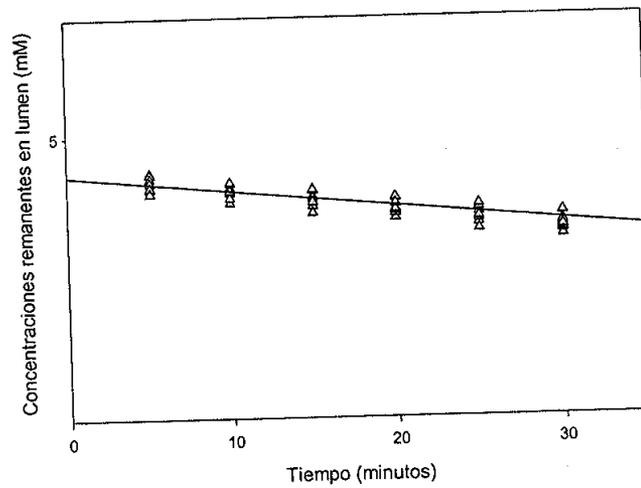


Figura 3.10 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 5 mM.

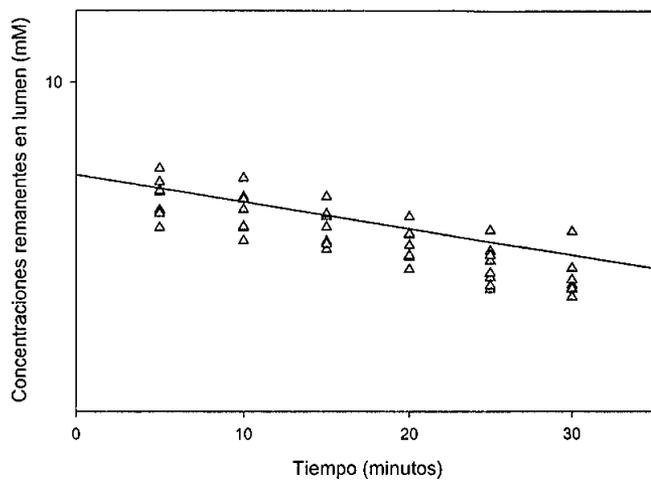


Figura 3.11 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 9 mM.

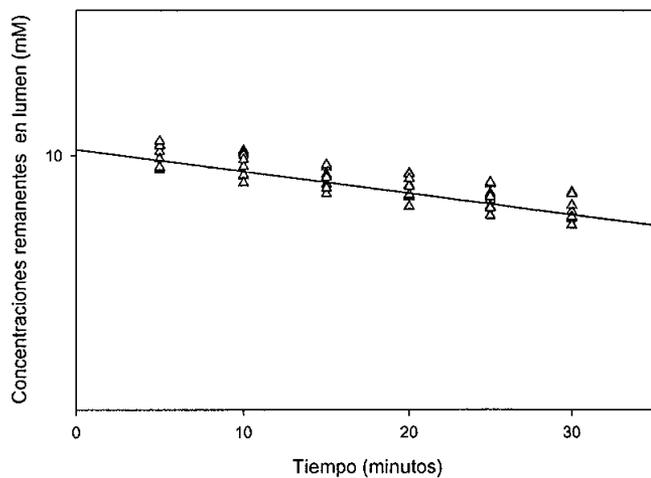


Figura 3.12 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 13 mM.

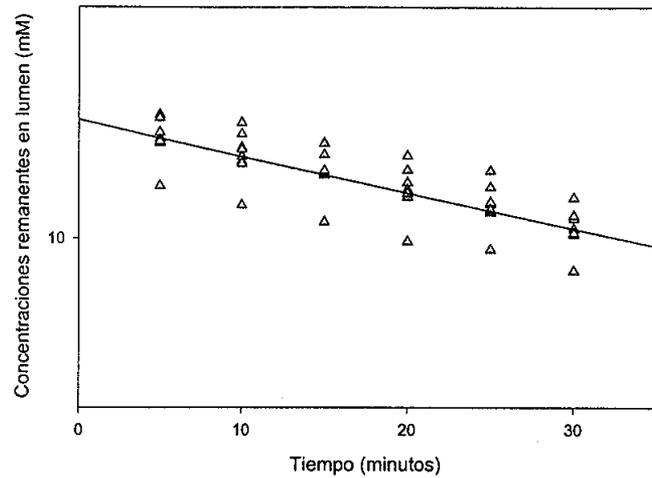


Figura 3.13 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 18 mM.

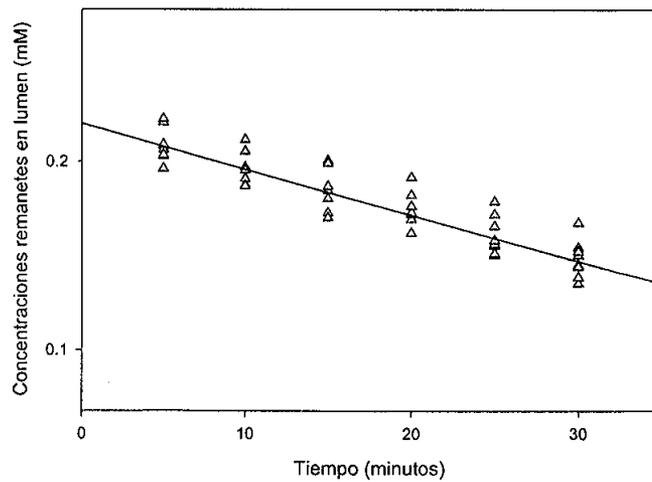


Figura 3.14 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de verapamilo 10 mM.

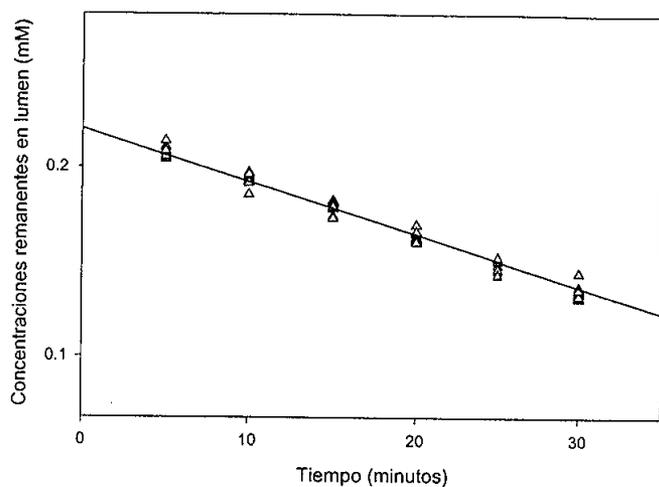


Figura 3.15 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de verapamil 20 mM.

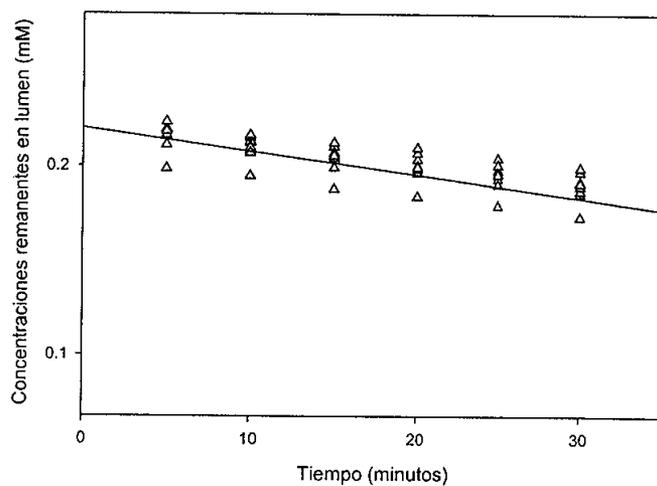


Figura 3.16 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de azida sódica 0.3 mM.

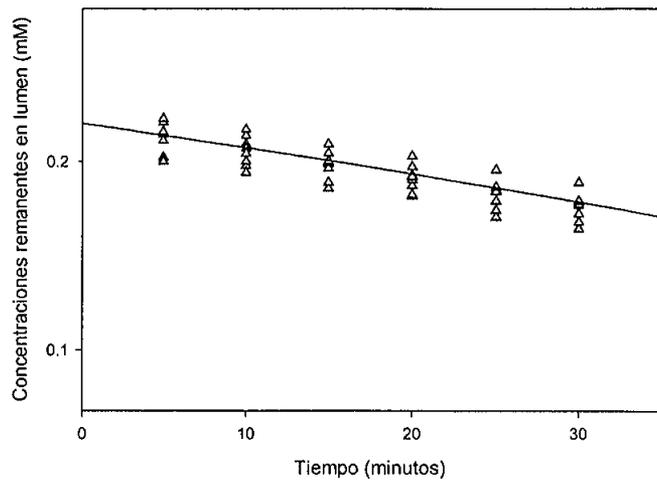


Figura 3.17 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de azida sódica 3 mM.

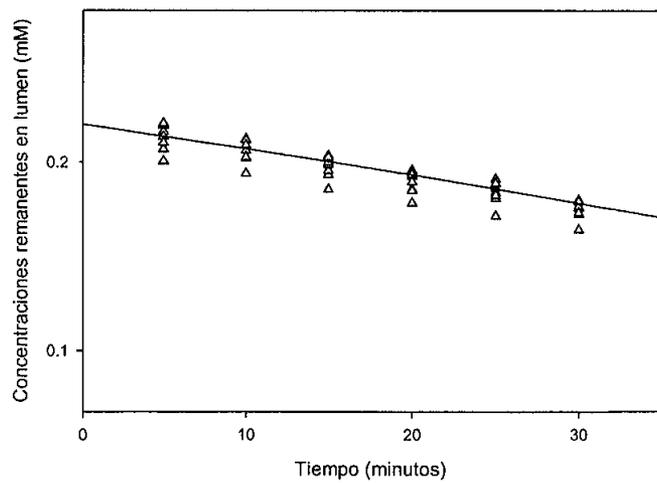


Figura 3.18 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de azida sódica 6 mM.

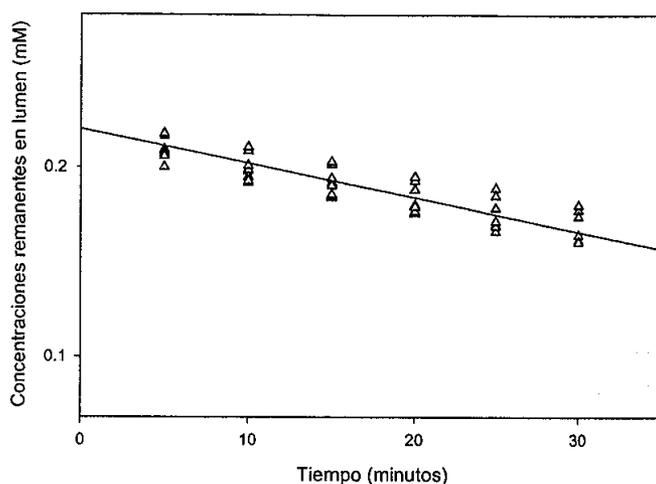


Figura 3.19 Representación gráfica del ajustado de las concentraciones remanentes en lumen intestinal frente al tiempo, para una concentración de salbutamol 0.29 mM en presencia de zumo natural de pomelo al 50% (V/V).

3.4.2 Absorción del salbutamol en tramos intestinales

3.4.2.1 Salbutamol a concentración 0.29 mM

Las concentraciones remanentes de salbutamol halladas para cada tiempo de muestreo y corregidas para la reabsorción de agua, después de la perfusión en los tramos proximal, medio, distal y colon de la rata de las soluciones del citado fármaco, han sido, en nuestras condiciones experimentales, las que se exponen en los **Cuadros 3.58 a 3.61**. Se indican los valores de las concentraciones individuales, así como el valor medio con la correspondiente desviación estándar. También se detallan los volúmenes remanentes a los 30 minutos, las constantes aparentes de velocidad de absorción, k_a , obtenidas por regresión no lineal de las concentraciones remanentes frente a los tiempos de muestreo y las constantes promedias con su desviación estándar. El ensayo de absorción se realizó empleando lotes de 8 animales para cada uno de los tramos seleccionados.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.254	0.232	0.245	0.250	0.257	0.258	0.261	0.232	0.249±0.011
10	0.245	0.221	0.236	0.238	0.246	0.248	0.249	0.223	0.238±0.011
15	0.236	0.213	0.225	0.230	0.237	0.236	0.243	0.213	0.229±0.011
20	0.227	0.205	0.219	0.223	0.229	0.226	0.235	0.204	0.220±0.011
25	0.219	0.197	0.210	0.216	0.217	0.216	0.227	0.195	0.212±0.011
30	0.211	0.189	0.204	0.210	0.208	0.206	0.219	0.187	0.204±0.011
V _r (mL)	4.00	4.29	4.24	4.20	4.00	4.50	3.70	3.40	4.04±0.35
k _a (h ⁻¹)	0.446	0.484	0.445	0.412	0.501	0.542	0.408	0.522	0.474
A ₀ (mM)	0.264	0.241	0.253	0.256	0.268	0.270	0.269	0.243	0.258
r (>)	0.999	0.999	0.995	0.995	0.996	0.999	0.995	0.999	0.999
k_a promedio = (0.469±0.050) h⁻¹									

Cuadro 3.58 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del tramo **proximal** a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (**V_r**) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (**k_a**) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (**A₀**) y coeficientes de correlación (**r**). También se consigna la constante de absorción promedio acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.222	0.231	0.249	0.237	0.248	0.239	0.244	0.235	0.238±0.009
10	0.216	0.222	0.244	0.231	0.241	0.228	0.237	0.231	0.231±0.009
15	0.210	0.217	0.236	0.224	0.235	0.223	0.230	0.222	0.225±0.009
20	0.203	0.211	0.229	0.219	0.230	0.218	0.223	0.216	0.219±0.009
25	0.197	0.206	0.222	0.212	0.223	0.212	0.216	0.210	0.212±0.008
30	0.191	0.200	0.216	0.206	0.217	0.205	0.212	0.203	0.206±0.009
V _r (mL)	4.30	4.50	4.50	4.15	4.50	4.55	4.60	4.50	4.45±0.15
k _a (h ⁻¹)	0.363	0.334	0.350	0.336	0.316	0.347	0.348	0.357	0.345
A ₀ (mM)	0.229	0.236	0.257	0.244	0.254	0.244	0.251	0.243	0.245
r (>)	0.999	0.994	0.997	0.998	0.998	0.993	0.996	0.993	0.999
k_a promedia = (0.344±0.015) h⁻¹									

Cuadro 3.59 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del tramo **medio** a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A₀) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.226	0.248	0.214	0.238	0.229	0.252	0.245	0.220	0.234±0.014
10	0.218	0.242	0.207	0.234	0.222	0.246	0.236	0.210	0.227±0.015
15	0.210	0.237	0.200	0.228	0.219	0.239	0.231	0.206	0.220±0.014
20	0.206	0.231	0.195	0.225	0.212	0.234	0.225	0.200	0.216±0.015
25	0.200	0.224	0.190	0.220	0.206	0.228	0.219	0.194	0.210±0.014
30	0.193	0.217	0.187	0.207	0.200	0.222	0.214	0.188	0.206±0.013
V _r (mL)	3.85	4.20	4.00	4.30	4.50	4.40	4.20	3.30	4.09±0.38
k _a (h ⁻¹)	0.366	0.315	0.331	0.302	0.320	0.303	0.319	0.362	0.330
A ₀ (mM)	0.232	0.255	0.218	0.246	0.235	0.258	0.250	0.225	0.240
r (>)	0.993	0.994	0.987	0.994	0.992	0.999	0.994	0.990	0.998
k_a promedia = (0.327±0.024) h⁻¹									

Cuadro 3.60 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del tramo **distal** a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A₀) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.264	0.275	0.246	0.259	0.256	0.260	0.250	0.254	0.258±0.009
10	0.254	0.265	0.236	0.248	0.246	0.249	0.239	0.245	0.248±0.009
15	0.241	0.255	0.229	0.232	0.236	0.233	0.229	0.233	0.236±0.008
20	0.234	0.248	0.219	0.226	0.226	0.225	0.222	0.223	0.228±0.009
25	0.226	0.239	0.211	0.214	0.217	0.214	0.212	0.214	0.218±0.009
30	0.216	0.231	0.203	0.204	0.209	0.205	0.203	0.205	0.209±0.010
V_r (mL)	4.10	4.10	4.80	4.20	4.00	4.00	4.10	4.00	4.16±0.27
k_a (h ⁻¹)	0.476	0.415	0.460	0.575	0.492	0.578	0.490	0.521	0.499
A_0 (mM)	0.274	0.284	0.255	0.271	0.267	0.272	0.260	0.266	0.269
r (>)	0.995	0.999	0.998	0.991	0.999	0.995	0.998	0.999	0.999
k_a promedia = (0.499±0.055) h⁻¹									

Cuadro 3.61 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del **colon** a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM**. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

Los resultados obtenidos al realizar una prueba no paramétrica de comparación múltiple (Dunnnett T3) con las constantes de velocidad de absorción obtenidas con la solución de salbutamol 0.29 mM en los diferentes tramos se consignan en el **Cuadro 3.62** Previamente se aplicó la prueba de Levene que demostró que las varianzas no son homogéneas ($p = 0.008$).

PRUEBA de DUNNETT T3				
TRAMO	PROXIMAL	MEDIO	DISTAL	COLON
PROXIMAL	-			
MEDIO	S	-		
DISTAL	S	NS	-	
COLON	NS	S	S	-

Cuadro 3.62 Resultados de la prueba de Dunnnett T3 realizada con las constantes de velocidad del salbutamol obtenidas después de la perfusión de salbutamol 0.29 mM en los diferentes tramos intestinales.

3.4.2.2 Influencia del verapamilo

En los **Cuadros 3.63** y **3.64**, se recogen las concentraciones remanentes obtenidas a lo diferentes tiempos de toma de muestra y corregidas para la reabsorción de agua, del salbutamol 0.29 mM en presencia de verapamilo a concentración 10 mM, es los tramos proximal y distal, respectivamente. También se detallan los volúmenes remanentes a los 30 minutos, las constantes aparentes de velocidad de absorción, k_a , obtenidas por regresión no lineal de las concentraciones remanentes medidas frente a los tiempos de muestreo y las constantes promedias con su desviación estándar. El ensayo de absorción se realizó empleando lotes de 8 animales para cada uno de los tramos seleccionadas.

En el **Cuadro 3.65**, se resumen los valores k_a promedios en cada uno de estos tramos, obtenidos con y sin verapamilo.

La prueba de Levene mostró que no existía homogeneidad entre las varianzas ($p=0.033$). En el **Cuadro 3.66** se detallan los resultados obtenidos al aplicar la prueba de comparación múltiple no paramétrica de Dunnett T3.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (\pm d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.235	0.249	0.250	0.248	0.243	0.243	0.246	0.215	0.241 \pm 0.012
10	0.226	0.235	0.239	0.240	0.232	0.234	0.238	0.206	0.231 \pm 0.011
15	0.217	0.229	0.229	0.231	0.221	0.225	0.231	0.199	0.222 \pm 0.011
20	0.207	0.219	0.220	0.224	0.211	0.216	0.220	0.192	0.214 \pm 0.010
25	0.199	0.214	0.210	0.217	0.201	0.208	0.212	0.185	0.206 \pm 0.010
30	0.193	0.208	0.202	0.209	0.192	0.200	0.205	0.177	0.198 \pm 0.011
V_r (mL)	4.10	4.50	4.50	4.70	4.50	4.50	4.20	4.70	4.46 \pm 0.21
k_a (h^{-1})	0.486	0.425	0.513	0.408	0.567	0.469	0.447	0.456	0.467
A_0 (mM)	0.245	0.255	0.261	0.256	0.255	0.253	0.256	0.223	0.250
r (>)	0.998	0.989	0.999	0.999	0.999	0.999	0.996	0.999	0.999
k_a promedia = (0.471\pm0.051) h^{-1}									

Cuadro 3.63 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del tramo **proximal**, a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionado de verapamilo 10 mM. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (V_r) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (k_a) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (A_0) y coeficientes de correlación (r). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

CONCENTRACIONES REMANENTES EN LUMEN INTESTINAL									
TIEMPO (min)	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN								VALOR MEDIO (± d.e.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
5	0.232	0.243	0.237	0.253	0.245	0.245	0.243	0.252	0.244±0.007
10	0.217	0.225	0.227	0.240	0.231	0.232	0.233	0.237	0.230±0.007
15	0.201	0.206	0.207	0.219	0.215	0.219	0.217	0.220	0.213±0.007
20	0.189	0.193	0.198	0.209	0.203	0.208	0.209	0.214	0.203±0.009
25	0.176	0.183	0.188	0.196	0.191	0.192	0.199	0.206	0.191±0.009
30	0.164	0.168	0.176	0.184	0.181	0.185	0.189	0.191	0.179±0.010
V _r (mL)	4.50	4.20	4.50	4.50	4.20	4.20	4.40	4.30	4.35±0.14
k _a (h ⁻¹)	0.834	0.876	0.720	0.774	0.738	0.696	0.606	0.630	0.734
A ₀ (mM)	0.249	0.260	0.252	0.270	0.260	0.260	0.256	0.263	0.259
r (>)	0.999	0.995	0.995	0.997	0.999	0.998	0.997	0.991	0.999
k_a promedia = (0.734±0.093) h⁻¹									

Cuadro 3.64 Concentraciones individuales y medias de salbutamol remanentes en lumen intestinal del tramo **distal**, a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas después de la perfusión de una solución de **salbutamol** a una concentración **0.29 mM** adicionada de verapamilo 10 mM. En la parte inferior del cuadro se indican los volúmenes remanentes individuales y medios (**V_r**) a los 30 minutos, acompañados de la desviación estándar, los valores individuales y el valor medio de las constantes de absorción aparentes (**k_a**) junto con la correspondiente desviación estándar, concentraciones iniciales aparentes (**A₀**) y coeficientes de correlación (**r**). También se consigna la constante de absorción promedia acompañada de la desviación estándar.

TRAMO	Verapamilo (mM)	N	$k_a \pm d.e$
PROXIMAL	0	8	0.469 ± 0.050
	10	8	0.471 ± 0.050
DISTAL	0	8	0.327 ± 0.024
	10	8	0.734 ± 0.093

Cuadro 3.65 Valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en los tramos proximal y distal después de la perfusión de salbutamol 0.29 mM solo y con verapamilo 10 mM.

PRUEBA de DUNNETT T3				
TRAMO	P	P+VER	D	D+VER
P	-			
P+ VERP	NS	-		
D	S	S	-	
D+VERP	S	S	S	-

Cuadro 3.66 Resultados de la prueba de Dunnett T3 realizada con las constantes de velocidad de absorción del salbutamol obtenidas en los tramos proximal y distal después de la perfusión de soluciones de salbutamol 0.29 mM solo y con verapamilo 10 mM.

3.5 ESTUDIO DE PERMEABILIDAD DEL SALBUTAMOL *IN VITRO*

3.5.1 Ensayos con células Caco-2 TC7

A continuación se detalla en los **Cuadros 3.67** y **3.68**, los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad del salbutamol realizados con monocapas de células Caco-2 TC7. Se indican cada una de las condiciones de ensayo y la dirección en la que se ha desarrollado el transporte. Los ensayos se realizaron con salbutamol solo y adicionado de diferentes inhibidores de los procesos activos de secreción intestinal. Asimismo, se muestra, en cada caso, la permeabilidad promedia junto con su desviación estándar.

En el **Cuadro 3.69**, se exponen los valores de P_{BA}/P_{AB} , para cada condición de ensayo.

En el **Cuadro 3.70**, se resume los resultados obtenidos tras aplicar la prueba no paramétrica de Dunnett T3 a todos los datos experimentales obtenidos con este tipo células. Esta prueba permite establecer entre qué grupos de valores existen diferencias significativas. Se ha aplicado esta prueba tras comprobar que las varianzas no eran homogéneas (prueba de Levene, $p = 0.001$).

En la **Figura 3.20** se muestra, mediante un histograma de barras, las permeabilidades obtenidas para el salbutamol a la concentración 100 μM en las diferentes condiciones de ensayo.

	AP-BL			
	Salbutamol 100 μ M	+ verapamilo 100 μ M	+ probenecid 100 μ M	+ zumo de pomelo
P_{ef} (cm/seg)	$3.509 \cdot 10^{-7}$	$5.088 \cdot 10^{-7}$	$5.887 \cdot 10^{-7}$	$6.072 \cdot 10^{-7}$
	$3.011 \cdot 10^{-7}$	$5.053 \cdot 10^{-7}$	$6.502 \cdot 10^{-7}$	$6.391 \cdot 10^{-7}$
	$3.921 \cdot 10^{-7}$	$6.059 \cdot 10^{-7}$	$4.634 \cdot 10^{-7}$	$7.117 \cdot 10^{-7}$
	$2.624 \cdot 10^{-7}$	$5.076 \cdot 10^{-7}$	$4.916 \cdot 10^{-7}$	$6.957 \cdot 10^{-7}$
	$2.589 \cdot 10^{-7}$	$6.711 \cdot 10^{-7}$	$5.162 \cdot 10^{-7}$	$7.227 \cdot 10^{-7}$
	$2.827 \cdot 10^{-7}$	$5.506 \cdot 10^{-7}$	$4.228 \cdot 10^{-7}$	
	$2.532 \cdot 10^{-7}$			
	Media \pm d.e	$(3.00 \pm 0.52) \cdot 10^{-7}$	$(5.58 \pm 0.67) \cdot 10^{-7}$	$(5.22 \pm 0.84) \cdot 10^{-7}$

Cuadro 3.67 Permeabilidades aparentes del salbutamol a la concentración 100 μ M obtenidas cuando la dirección del transporte es AP-BL. Se indica el valor promedio para cada condición de ensayo acompañado de la desviación estándar.

	BL-AP			
	Salbutamol 100 μ M	+ Verapamilo 100 μ M	+ Probenecid 100 μ M	
P_{ef} (cm/seg)	4.474 · 10 ⁻⁷	4.517 · 10 ⁻⁷	2.974 · 10 ⁻⁷	
	4.621 · 10 ⁻⁷	3.220 · 10 ⁻⁷	3.859 · 10 ⁻⁷	
	7.104 · 10 ⁻⁷	3.511 · 10 ⁻⁷	2.578 · 10 ⁻⁷	
	9.871 · 10 ⁻⁷	3.073 · 10 ⁻⁷	2.171 · 10 ⁻⁷	
	8.989 · 10 ⁻⁷	3.662 · 10 ⁻⁷	2.507 · 10 ⁻⁷	
	4.449 · 10 ⁻⁷	4.621 · 10 ⁻⁷	2.423 · 10 ⁻⁷	
	3.786 · 10 ⁻⁷			
	6.502 · 10 ⁻⁷			
	4.523 · 10 ⁻⁷			
	4.621 · 10 ⁻⁷			
	4.498 · 10 ⁻⁷			
	4.867 · 10 ⁻⁷			
	4.449 · 10 ⁻⁷			
	Media ± d.e	(5.59±1.93) 10⁻⁷	(3.77±0.65) 10⁻⁷	(2.75±0.60) 10⁻⁷

Cuadro 3.68 Permeabilidades aparentes del salbutamol 100 μ M obtenidas cuando la dirección del transporte es BL-AP. Se indica el valor promedio para cada condición de ensayo acompañado de la desviación estándar.

	P_{BA}/P_{AB}
Salbutamol 100 μ M	1.86
+ Verapamilo 100 μ M	0.67
+ Probenecid 100 μ M	0.41

Cuadro 3.69 Coeficiente P_{BA}/P_{AB} en cada condición de ensayo.

PRUEBA de DUNNETT T3							
Condición	1	2	3	4	5	6	7
1) Salbutamol 100 μ M AP-BL	-						
2) Salbutamol 100 μ M BL-AP	S	-					
3) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M AP-BL	S	NS	-				
4) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M BL-AP	NS	NS	S	-			
5) Salbutamol 100 μ M + Probenecid 100 μ M AP-BL	S	NS	NS	NS	-		
6) Salbutamol 100 μ M + Probenecid 100 μ M BL-AP	NS	S	S	NS	S	-	
7) Salbutamol 100 μ M + Zumo Pomelo AP-BL	S	NS	NS	S	NS	NS	-

Cuadro 3.70 Resultados de la prueba de Dunnett T3 realizada con las permeabilidades aparentes obtenidas en cada condición de ensayo: 1) Salbutamol 100 μ M AP-BL; 2) Salbutamol 100 μ M BL-AP; 3) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M AP-BL; 4) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M BL-AP; 5) Salbutamol 100 μ M + Probenecid 100 μ M AP-BL; 6) Salbutamol 100 μ M + Probenecid 100 μ M BL-AP; 7) Salbutamol 100 μ M + zumo de pomelo natural (en la proporción 1:3 (V/V)) AP-BL.

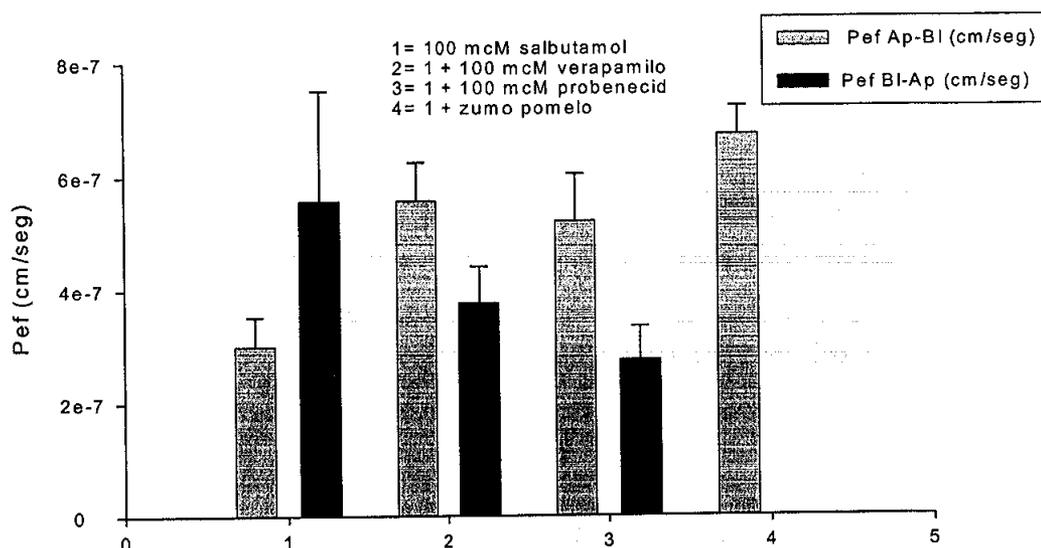


Figura 3.20 Representación gráfica de las P_{ef} (cm/seg) promedias obtenidas para el salbutamol $100 \mu\text{M}$ en las distintas condiciones de ensayo.

3.5.2 Ensayos con células MDCK

A continuación se detalla en los **Cuadro 3.71**, los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad realizados con estas células. Se indican cada una de las condiciones de ensayo y la dirección en la que se ha realizado el transporte. Los ensayos se realizaron con salbutamol solo y adicionado de verapamilo, inhibidor específico de la glicoproteína P. Asimismo se muestra la permeabilidad promedio junto con su desviación estándar.

En el **Cuadro 3.72**, se exponen los valores de P_{BA}/P_{AB} , para cada condición de ensayo.

En el **Cuadro 3.73**, se resume la prueba no paramétrica aplicada a estos datos, prueba de Dunnett T3, que permite establecer entre qué grupos de valo-

res existen diferencias significativas. Se ha aplicado esta prueba porque las varianzas resultaron no ser homogéneas al aplicar la prueba de Levene ($p=0.003$).

En la **Figura 3.21** se muestra, mediante un histograma de barras, las permeabilidades obtenidas para el salbutamol a la concentración 100 μM en ausencia y en presencia de verapamilo a la concentración 100 μM .

	AP-BL		BL-AP	
	Salbutamol 100 μM	+ Verapamilo 100 μM	Salbutamol 100 μM	+ Verapamilo 100 μM
P_{ef} (cm/seg)	$3.589 \cdot 10^{-7}$	$3.884 \cdot 10^{-7}$	$9.636 \cdot 10^{-7}$	$2.519 \cdot 10^{-7}$
	$3.171 \cdot 10^{-7}$	$3.859 \cdot 10^{-7}$	$5.949 \cdot 10^{-7}$	$2.322 \cdot 10^{-7}$
	$4.425 \cdot 10^{-7}$	$3.712 \cdot 10^{-7}$	$5.703 \cdot 10^{-7}$	$2.827 \cdot 10^{-7}$
	$5.457 \cdot 10^{-7}$	$3.023 \cdot 10^{-7}$	$9.906 \cdot 10^{-7}$	$3.773 \cdot 10^{-7}$
	$4.461 \cdot 10^{-7}$	$5.826 \cdot 10^{-7}$	$6.232 \cdot 10^{-7}$	$4.203 \cdot 10^{-7}$
	$5.678 \cdot 10^{-7}$	$5.899 \cdot 10^{-7}$	$8.616 \cdot 10^{-7}$	$3.872 \cdot 10^{-7}$
	Media \pm d.e	$(4.46 \pm 0.99) 10^{-7}$	$(4.38 \pm 1.20) 10^{-7}$	$(7.67 \pm 1.93) 10^{-7}$

Cuadro 3.71 Permeabilidades aparentes del salbutamol a concentración 100 μM obtenidas cuando la dirección del transporte es Ap-BI y BI-Ap. Se indica el valor medio para cada condición ensayada acompañado de su desviación estándar.

	P_{BA}/P_{AB}
Salbutamol 100 μ M	1.72
+ Verapamilo 100 μ M	0.74

Cuadro 3.72 Cociente P_{BA}/P_{AB} en cada condición

PRUEBA de DUNNETT T3				
CONDICIÓN	1	2	3	4
1) Salbutamol 100 μ M AP-BL	-			
2) Salbutamol 100 μ M BL-AP	S	-		
3) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M AP-BL	NS	S	-	
4) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M BL-AP	NS	S	NS	-

Cuadro 3.73 Resultados de la prueba de Dunnett T3 realizada con las permeabilidades aparentes obtenidas en cada condición de ensayo: 1) Salbutamol 100 μ M AP-BL; 2) Salbutamol 100 μ M BL-AP; 3) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M AP-BL; 4) Salbutamol 100 μ M + Verapamilo 100 μ M BL-AP.

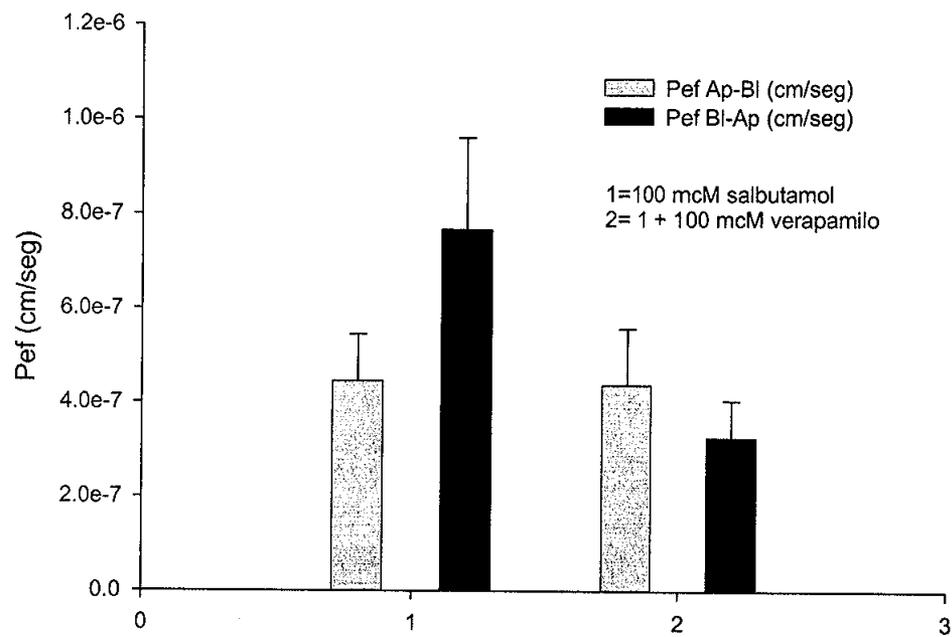


Figura 3.21 Representación gráfica de las P_{ef} (cm/seg) promedias obtenidas para el salbutamol $100 \mu\text{M}$ en las distintas condiciones de ensayo.

3.6 ESTIMACION DEL NIVEL DE mRNA DE LA GLICOPROTEÍNA-P MEDIANTE RT-PCR

En la **Figura 3.22** se muestran los niveles de mRNA mensajero que codifican para la glicoproteína P obtenidos al utilizar la técnica semiquantitativa RT-PCR. Estos niveles se han analizado en los ciclos 22, 24, 26, 28, 30 y 32. Se detallan para el estómago, tramos del tracto intestinal (proximal, medio, distal y colon), mucosa bucal y pulmón. Asimismo, se acompañan de los niveles de ciclofilina obtenidos en cada uno de los tejidos analizados, para cada ciclo de toma de muestra.

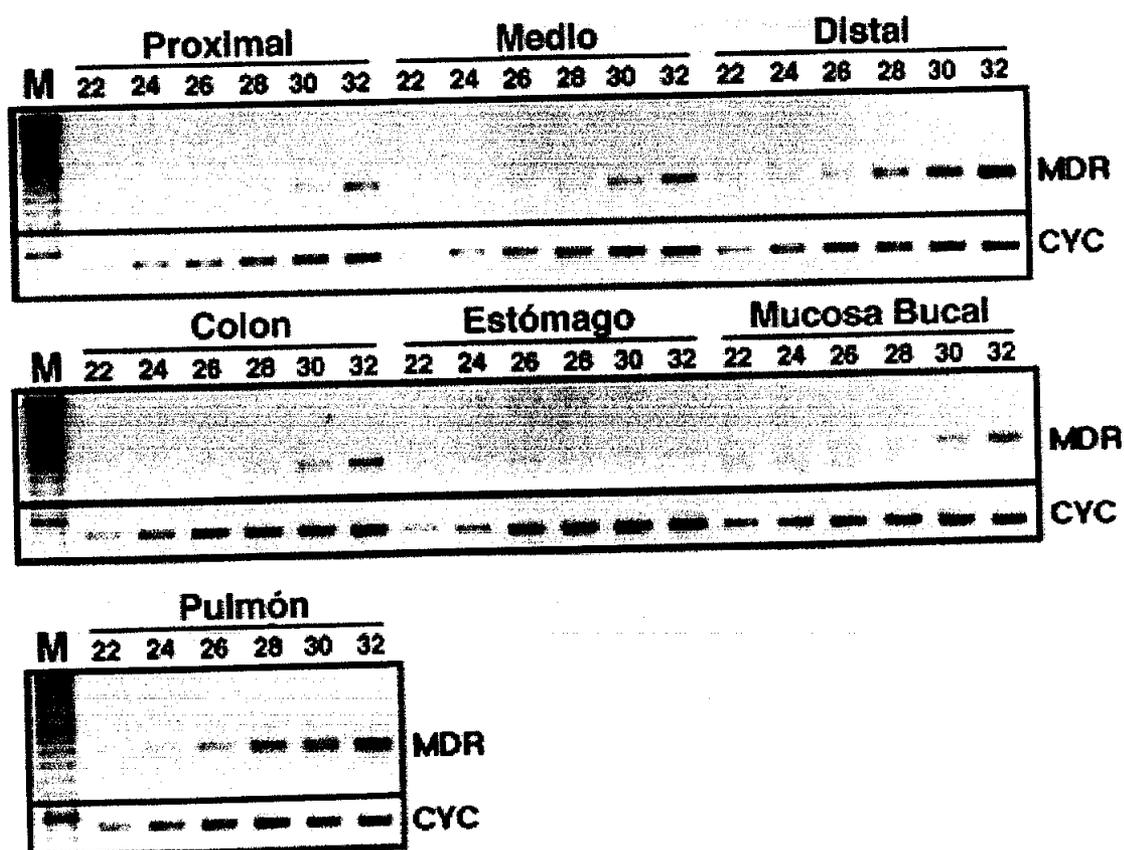


Figura 3.22 Estimación semiquantitativa de la cantidad de RNA mensajero que codifica para la glicoproteína P en diferentes tejidos.

Capítulo 4

DISCUSIÓN

4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La valoración del salbutamol se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, técnica que permite la separación del β -agonista del resto de sustancias presentes en las muestras intestinales y su cuantificación, con buena reproducibilidad y sensibilidad.

La detección llevó a cabo por fluorescencia, ya que es mucho más sensible que la detección por ultravioleta. Las longitudes de onda de excitación y de emisión seleccionadas, se determinaron previamente realizando un barrido en un fluorímetro. De este modo, se reducen al mínimo las posibles interferencias de compuestos endógenos presentes en las muestras biológicas, dado que generalmente, no poseen capacidad fluorescente.

Como paso previo a la utilización de esta técnica, se procedió a su validación con objeto de justificar su utilización como procedimiento analítico.

En primer lugar se determinó si, en el ámbito de concentraciones valoradas, existía linealidad entre las áreas de los cromatogramas y las concentraciones determinadas. Para ello, se realizó una recta de calibración que incluyó el ámbito de concentraciones valoradas. Como se muestra en la **Figura 3.1**, el coeficiente de correlación determinado es muy próximo a la unidad, confirmándose la excelente linealidad entre las concentraciones valoradas y las áreas obtenidas de los cromatogramas. La prueba estadística F de Snedecor, determinó que la ecuación de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales es la más sencilla, es decir, la que carece de ordenada en el origen (**Cuadro 3.2**). Este hecho permite valorar las muestras intestinales utilizando una única muestra de un patrón externo, sin necesidad de construir una recta de calibración completa para cada ensayo.

La validación del método de valoración empleado, se completó realizando ensayos de precisión y exactitud. Éstos se han descrito en el *Epígrafe 3.1.2*. Los coeficientes de variación nunca superaron el 4.54 % y los errores relativos, el 3.33

%. Por ello, se puede considerar que la técnica de valoración del salbutamol, dentro del ámbito de concentraciones ensayadas, es plenamente satisfactoria y justifica su empleo para el fin propuesto (*Shah V.P. y col., 1992*).

La cuantificación de las muestras procedentes de los ensayos *in vitro* se realizó por interpolación en una recta de calibración, desarrollada simultáneamente a la realización de la experiencia. Aunque la prueba estadística F de Snedecor, determinó que la ecuación de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales es la más sencilla, es decir, la que carece de ordenada en el origen (**Cuadro 3.6**), en esta ocasión se consideró más apropiado no utilizar simplemente un patrón de referencia externo, dado el orden de magnitud (muy pequeña) de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro*. También se realizaron ensayos de precisión y exactitud cuando la técnica de valoración se aplicó a las soluciones utilizadas en los ensayos *in vitro* (**Cuadros 3.7 a 3.10**). Los coeficientes de variación no superaron el 2.07% y los errores relativos fueron menores de 4.11%.

La valoración de la antipirina también se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección UV, según un método puesto a punto, previamente, en nuestro laboratorio (*Merino M. y col., 1989*). Esta técnica analítica se validó siguiendo las pautas anteriormente expuestas y resultó ser satisfactoria para el ámbito de concentraciones ensayadas (**Figura 3.2 y Cuadros 3.18 a 3.20**).

4.2 ESTUDIOS DE ABSORCIÓN: TÉCNICAS EXPERIMENTALES

4.2.1 Ensayos de absorción intestinal *in situ*

Para los ensayos de absorción intestinal del salbutamol se ha seleccionado la rata como animal de experimentación, ya que se ha demostrado previamente su validez como modelo para caracterizar los procesos de absorción intestinal.

La zona del tracto gastrointestinal seleccionada, en principio, ha sido el intestino delgado, tanto en su totalidad como en diferentes tramos. Éste órgano constituye el lugar de absorción por excelencia, tanto para principios inmediatos como para fármacos y xenobióticos en general.

Existen dos tipos de métodos para llevar a cabo los estudios de absorción de fármacos en el animal vivo: directos e indirectos.

En los métodos indirectos, la constante aparente de absorción se estima a partir del tratamiento matemático de las curvas de nivel plasmático obtenidas después de la administración del fármaco por una vía en la que media la absorción. Por ejemplo, en el caso de la absorción intestinal, cuando se usa la rata como animal de experimentación, se introduce la solución objeto de estudio en el estómago del animal de experimentación, mediante una jeringuilla especialmente diseñada para la administración oral. Posteriormente, la determinación de la constante de velocidad de absorción se realiza a partir de los niveles plasmáticos del fármaco.

Los métodos directos, en la práctica, sólo acostumbran a realizarse con animales de experimentación, ya que la constante aparente de absorción se obtiene mediante regresión de las concentraciones de fármaco remanentes en el lugar de absorción a los diferentes tiempos de toma de muestra, lo que condiciona, habitualmente, el acceso mediante técnicas quirúrgicas a las zonas donde se realiza el ensayo y el posterior sacrificio del animal.

Para realizar los ensayos descritos en esta Memoria se ha elegido un método directo de perfusión intestinal *in situ*, del que se posee amplia información (Doluisio J.T. y col., 1969; Martín Villodre A. y col., 1986). La perfusión *in situ*, mantiene las constantes vitales del animal y provoca un movimiento de la solución perfundida muy similar al que se da en las condiciones fisiológicas en las que discurre el proceso de absorción intestinal. Además, el flujo sanguíneo permite mantener las condiciones de sumidero durante todo el ensayo de absorción.

Por otra parte, el volumen de solución perfundida permanece durante todo el ensayo en contacto con la mucosa intestinal (excepto en los periodos de toma de muestra), de modo que se obtiene un rendimiento más elevado de la absorción que en los métodos de perfusión en continuo.

Con esta metodología de trabajo, se obtienen las constantes aparentes de velocidad de absorción del fármaco sin que éstas se vean afectadas por factores que *in vivo* sí las modifican, como puede ser la disolución si se administra una forma agregada o si el fármaco precipita en el estómago.

Además, esta técnica permite la corrección de las concentraciones experimentales determinadas, ya que considera el proceso de reabsorción de agua que se produce en el intestino. La reabsorción de agua sigue una cinética de orden cero (Martín Villodre A. y col., 1986; Gabus Sannié C. Y Buri P., 1987). Las muestras deben corregirse para la reabsorción de agua cuando ésta supera el 10% del volumen perfundido. En estas condiciones, el proceso de reabsorción determina que las concentraciones remanentes de fármaco en el lumen intestinal se vayan concentrando a lo largo del tiempo que dura el ensayo, lo que se traduce en la determinación de un valor incorrecto de la constante de velocidad aparente, valor que estará falseado por defecto. En el *Epígrafe 2.2.6* se detalla cómo se realiza este ensayo y en el *Epígrafe 2.2.7*, el tratamiento matemático que se aplica para el cálculo de las concentraciones corregidas.

Como parámetro representativo del proceso de absorción se ha utilizado la constante aparente de primer orden de velocidad de absorción (k_a), por varias razones:

- Es un índice de la velocidad de absorción intrínseca del soluto, ya que para espacios de tiempo reducidos (30'), cuando la cinética puede ajustarse a un proceso de primer orden, el cociente $(dA/dt)/A$ es sensiblemente igual a la constante aparente del proceso (valor k_a), determinada experimentalmente.

- El cálculo del valor de k_a resulta fácil a partir de los resultados obtenidos experimentalmente.
- La constante, aunque en ocasiones sólo representa un valor aparente, permite cuantificar el proceso de absorción y determinar si los resultados obtenidos en las distintas condiciones de trabajo son significativamente distintos, después de aplicar los procedimientos estadísticos habituales.

4.2.2 Ensayos de absorción *in vitro*

Como se ha indicado en el *Epígrafe 1.3.1*, el uso de líneas celulares presenta determinadas ventajas frente a la experimentación con animales, pero debe reseñarse que también tiene una serie de limitaciones. Por ejemplo, las monocapas celulares están desprovistas de aporte sanguíneo, lo que implica que los parámetros cinéticos determinados sean significativamente diferentes a los que caracterizan la absorción en condiciones normales, cuando existe flujo mesentérico y, también, presentan un coste de mantenimiento más elevado.

No obstante, ambos tipos de experiencias (con animales y con células) resultan interesantes, porque la información que aportan resulta complementaria y puede ayudar a interpretar los resultados conseguidos.

Actualmente se dispone de gran cantidad de bibliografía en la que se han establecido numerosas correlaciones entre datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* o *in situ*, lo cual determina que los modelos celulares presenten una validez predictiva de los valores aparentes de velocidad de absorción de fármacos.

En la presente Memoria se han utilizado dos modelos celulares diferentes: la línea celular Caco-2 TC7 y la línea celular MDCK.

Normalmente, el modelo elegido para el estudio *in vitro* de la absorción intestinal de fármacos es el de células Caco-2. Sin embargo, en nuestras experiencias, se ha considerado más adecuado utilizar el clon TC7, ya que, además de expresar más glicoproteína P en la membrana apical que las células Caco-2 algunos autores

afirman que, a su vez, en las microvellosidades, posee mayor expresión de enzimas, como la hidrolasa sucrasa isomaltasa o la glucuronosiltransferasa, lo que reproduce, con mayor fidelidad, la situación del epitelio intestinal (*Caro I. y col., 1995*).

El modelo de células renales MDCK se ha elegido para comparar los resultados obtenidos en las células intestinales Caco-2 TC7. Las células MDCK se caracterizan por la menor expresión de la glicoproteína P pero, al igual que las Caco-2 TC7, constituyen un modelo aceptado para el estudio del transporte intestinal de fármacos, preferentemente de aquellos que se absorben por difusión pasiva.

Numerosos trabajos publicados, en los que se han comparado las permeabilidades de diferentes compuestos determinados en células Caco-2 y MDCK, han permitido concluir que ambos modelos son comparables, puesto que los valores de los coeficientes de permeabilidad que se obtienen resultan similares en ambas líneas celulares, al menos para compuestos cuya absorción es pasiva (*Ranaldi G. y col., 1992; Irvine J.D. y col., 1999*). La utilización de las células renales permite una predicción más rápida del mecanismo de absorción de un determinado fármaco, ya que entre el quinto y el décimo día tras su siembra en los filtros de policarbonato se forma una monocapa de células polarizadas y diferenciadas, lista para iniciar con ella el ensayo de transporte. Sin embargo, las Caco-2 necesitan de 17 a 21 días para formar el monoestrato polarizado y diferenciado, lo que retrasa el inicio de los ensayos en el tiempo.

En la presente Memoria se han seguido los protocolos de manipulación celular desarrollados en el Istituto Nazionale della Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) de Roma (*Ranaldi G. y col., 1992*). Durante la permanencia de la doctoranda, por un periodo de 6 meses, en el citado centro, y bajo la supervisión de la Dra. Giulia Ranaldi, se aprendió el tratamiento de ambas líneas celulares, así como el desarrollo de los estudios de transporte. Esto permitió, posteriormente, instaurar dicha metodología de trabajo en nuestro laboratorio y completar los ensayos que allí se comenzaron.

Como parámetro representativo del proceso de absorción se ha utilizado la permeabilidad efectiva o aparente (P_{ef}), *Ecuación 1.13*, debido a que permite la caracterización del flujo transcelular independientemente de la concentración inicial ensayada, del área de filtro utilizada y del tiempo de toma de muestra.

Como parámetro representativo de la integridad de la monocapa celular se ha utilizado el valor de resistencia transepitelial (TEER). Los valores de TEER obtenidos en las células MDCK fueron considerablemente menores a los determinados en las Caco-2 TC7, de acuerdo con lo especificado en varias publicaciones (*Ranaldi G. y col., 1992; Irvine J.D. y col., 1999*). Aquellas monocapas que presentaron valores de TEER corregidos inferiores a $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ no se utilizaron en los ensayos de permeabilidad. Sólo se emplearon aquellos cuyos valores de TEER se encontraron entre 170 y $130 \Omega \cdot \text{cm}^2$. En las Caco-2-TC7, los valores de resistencia normalmente se encontraron alrededor de $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Aquellos filtros cuyos valores de TEER fueron inferiores a $280 \Omega \cdot \text{cm}^2$ se despreciaron.

Como control complementario de la integridad del monoestrato se utilizó un marcador del espacio paracelular: el rojo fenol. Esta sustancia posee un peso molecular de 376.4. Debido a su tamaño e hidrofilia, sólo es capaz de atravesar, de forma apreciable, la monocapa cuando las uniones estrechas entre las células se abren, dejando espacio suficiente. Por ello, sólo se detectará su presencia en el compartimiento receptor cuando la monocapa pierda su integridad. Se considera que el monoestrato celular se encuentra íntegro cuando el paso de rojo fenol a su través no supera el 1% en una hora. Entre la TEER y el paso de rojo fenol, existe una relación inversa de manera que a medida que disminuye el valor de TEER de la monocapa, se observa un aumento del paso de rojo fenol a través de ella.

4.3 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN

Durante los ensayos de absorción, el salbutamol se encuentra en solución a un pH cercano a la neutralidad, a 37°C y en contacto con las paredes intestinales, en las que pueden existir bacterias de la flora saprofítica. En consecuencia, entendimos que era posible que se produjera una disminución de la concentración de fármaco a lo largo del ensayo, como consecuencia de una degradación de tipo físico-químico o microbiológico, lo que podría dar lugar a una falsa interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos de absorción.

Para investigarlo, se han realizado los ensayos de degradación descritos en el *Epígrafe 2.2.7*.

Como puede observarse en los **Cuadros 3.25 y 3.28**, el análisis de varianza de una vía ha demostrado que no existe variación significativa de la concentración de salbutamol con los tiempos de incubación. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, la disminución de concentración de salbutamol en el lumen intestinal en función del tiempo, no se debe a un efecto de degradación del fármaco y puede atribuirse únicamente a su absorción.

4.4 ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL SALBUTAMOL

El salbutamol es un agonista β_2 que se utiliza en terapéutica, preferentemente, por sus potentes efectos broncodilatadores.

Para las crisis agudas de asma se utiliza, habitualmente, en forma de aerosol cuyos efectos son, por desgracia, fugaces. Además, su uso continuado puede conducir a una resecaión excesiva de la mucosa bronquial.

Por ello, la vía transpulmonar, aunque extraordinariamente útil, no resulta una vía de elección en una terapia crónica. Con objeto de mejorar la calidad de vida del paciente, la vía oral sería la alternativa más adecuada en los tratamientos

crónicos. Sin embargo, la limitación de esta vía de administración viene determinada por la baja biodisponibilidad oral que proporciona.

Lo ideal sería desarrollar una forma farmacéutica que obviara este problema. Para ello, sería necesario conocer los factores que modulan la biodisponibilidad oral del fármaco, como las pérdidas presistémicas por metabolismo y también por secreción a partir de los enterocitos del intestino delgado. Los procesos de metabolismo intestinal conducen a una pérdida de biodisponibilidad en magnitud debido a que parte de la dosis administrada se elimina por biotransformación y no llega a la circulación general. Los procesos de secreción, aunque desde un punto de vista teórico no afectan a la constante intrínseca de absorción (k_a), en la práctica suponen una disminución en la velocidad de absorción aparente (dA/dt) y, además, pueden determinar pérdidas de biodisponibilidad en magnitud.

En este sentido, ensayos previos, realizados en nuestro departamento con el salbutamol, pusieron de manifiesto que tras la administración oral en la rata de salbutamol 0.29 mM, los niveles plasmáticos que se alcanzaban eran inferiores a los calculados teóricamente.

Trabajos de investigación recientemente publicados sobre fármacos β -bloqueantes, como el acebutolol, celiprolol, nadolol y timolol, han puesto de manifiesto que, una vez se han absorbido a través de las células absorbentes intestinales, sufren una pérdida presistémica debida, en parte, a la contribución de la glicoproteína P (Terao T. y col., 1996). Aunque el salbutamol sea un fármaco β -agonista y, por lo tanto, farmacológicamente muy diferente de los citados, estructuralmente presenta una cierta similitud con los β -antagonistas anteriormente mencionados (**Figura 4.1**).

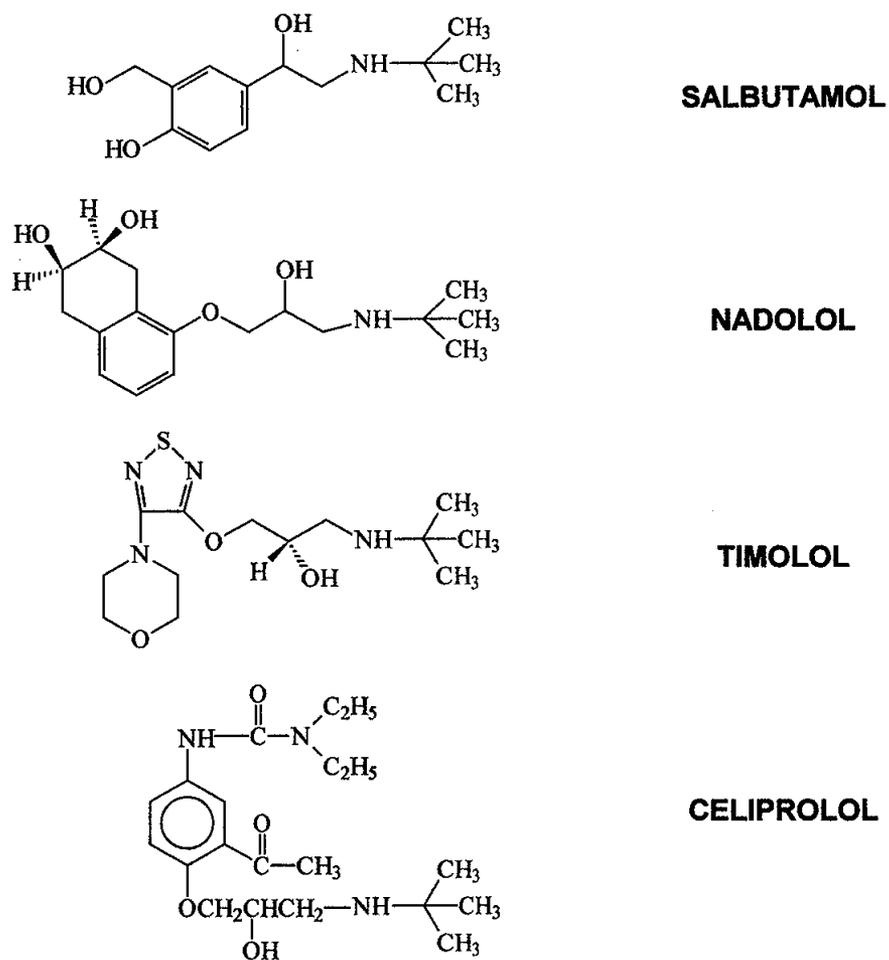


Figura 4.1 Estructuras químicas del β -agonista salbutamol y de tres β -antagonistas: nadolol, timolol y celiprolol.

Esta consideración junto con la información previa que se disponía referente a su baja y variable biodisponibilidad oral hizo pensar que podría ser también sustrato del mencionado mecanismo intestinal de secreción activa o de otros presentes en el intestino.

Con el fin de esclarecer esta hipótesis, se iniciaron ensayos de absorción intestinal del salbutamol *in situ*.

4.4.1 Absorción intestinal del salbutamol en intestino delgado completo de la rata

Estos ensayos se programaron de la siguiente manera:

1º) Perfusión de soluciones del fármaco a concentraciones crecientes.

2º) Ensayos de inhibición de diferentes sistemas de secreción. Para ello se emplearon: un inhibidor específico del sistema MDR1 (glicoproteína P), el verapamilo; un inhibidor metabólico, la azida sódica; y, por último, un compuesto natural que puede ingerirse con la dieta: el zumo de pomelo.

4.4.1.1 Soluciones de salbutamol a concentración creciente

Recientes investigaciones han puesto de manifiesto que los procesos de secreción intestinal, independientemente de su naturaleza, se caracterizan por ser dependientes de la dosis, ya que están mediados por proteínas portadoras.

Con objeto de detectar la posible intervención de procesos no lineales en la incorporación de salbutamol al organismo, se consideró oportuno perfundir en el intestino de la rata, un amplio ámbito de concentraciones del fármaco.

Las concentraciones seleccionadas fueron: 0.15, 0.29, 1.2, 5, 9, 13 y 18 mM. Entre ellas se incluyen la dosis habitual utilizada en humanos, extrapolada para los animales de experimentación (0.29 mM). Por otra parte, una concentración que representa el 50% de la alométrica (0.15 mM), ya que la bibliografía consultada recomienda que, cuando se desarrollan estudios de secreción intestinal con modelos animales, se deben utilizar concentraciones bajas de sustrato porque de

otro modo el sustrato puede saturar el sistema secretor y el proceso de secreción quedar enmascarado (*Spahn-Langguth H. y col., 1998*). En el extremo superior del intervalo de concentraciones, se ha considerado la concentración 18 mM, 120 veces superior a la concentración más pequeña ensayada. Con ello se desea conseguir información mediante el empleo de un ámbito de concentraciones lo más amplio posible, que nos permita, a su vez, estudiar la linealidad o no linealidad del proceso.

En el *Capítulo 3* se han expuesto las constantes aparentes de velocidad obtenidas para cada una de las siete concentraciones de salbutamol perfundidas en el intestino delgado de la rata. Como se observa, los valores de las constantes varían con la concentración. La prueba Dunnett T3 confirma esta observación, ya que detectó la existencia de diferencias significativas entre los valores de las constantes de absorción aparentes del salbutamol determinadas. Esto indica la existencia de no linealidad en el proceso de incorporación.

A continuación, se procedió al ajustado matemático de los datos experimentales.

El hecho de que las constantes aumenten al aumentar la concentración hasta alcanzar, al menos en apariencia, un valor asintótico, se puede justificar mediante la existencia de un proceso pasivo de incorporación seguido de un proceso activo de secreción saturable. Para comprobar esta hipótesis se han realizado dos tipos de ajustados. Previamente, se utilizó una ecuación funcional que, pese a sus limitaciones, permite iniciar el estudio del proceso de incorporación y posible secreción del salbutamol a nivel intestinal. Posteriormente, se procedió al ajuste definitivo de los datos mediante las ecuaciones diferenciales que se especifican en el *Epígrafe 2.6*.

Ajustado funcional

Este ajustado se realizó mediante el programa Sigma-Plot 5.0, basado en el algoritmo de Marquardt, según la siguiente ecuación:

$$-\frac{dA}{dt} = k_a \cdot A - \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

en la que k_a es la constante de absorción intrínseca del salbutamol obtenida en nuestras condiciones de trabajo, A representa la concentración de salbutamol remanente en el fluido luminal y V_m y K_m corresponden a la velocidad máxima y constante de Michaelis del proceso de secreción activa. Si sacamos A , factor común, en la ecuación, y se pasa al primer miembro se obtiene:

$$-\frac{dA/dt}{A} = k_a - \frac{Vm_s}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Por definición, $-(dA/dt)/A$ representa la constante aparente de absorción determinada experimentalmente, k'_a , de tal modo que :

$$k'_a = k_a - \frac{Vm_s}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Conforme aumenta la cantidad de fármaco en el lugar de absorción, el cociente Vm_s/Km_s+A , disminuye y cuando A es tan grande que el proceso de secreción comienza a saturarse, Vm_s es mucho más pequeña que Km_s+A y el cociente tiende a cero. En ese momento se puede considerar que $k'_a \cong k_a$, es decir, que la constante de absorción que se ha determinado experimentalmente (valor asintótico) tiende al valor de la constante intrínseca de absorción del fármaco.

Se debe indicar que los valores A disminuyen a lo largo del proceso de absorción, pero esta variación no se ha considerado porque complicaría el ajustado y no modificaría el sentido global de la interpretación de los resultados. Por ello, se han considerado como valores de A , los valores A_0 para cada serie, que representan las concentraciones iniciales de perfusión del salbutamol, de modo que la *Ecuación 4.3* resulta ser:

$$k'_a = k_a - \frac{Vm_s}{Km_s + A_0} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Los valores de los parámetros determinados fueron: $V_m = 0.0860 \pm 0.024$ mM·h⁻¹; $Km_s = 0.0836 \pm 0.068$ mM; $k_a = 0.649 \pm 0.016$ h⁻¹ (SS = 0.0094; r = 0.984), donde r es el coeficiente de correlación entre los valores k_a predichos por el modelo y los valores k'_a obtenidos.

Como se ha indicado, este ajustado es funcional pero permite obtener resultados aceptables. En la **Figura 4.2** se muestra la gráfica del ajustado, obtenida al representar los valores k'_a obtenidos experimentalmente frente a las concentraciones de salbutamol perfundidas.

Los parámetros cinéticos determinados con el ajustado funcional se utilizaron como estimas preliminares en el ajustado diferencial, tal como se detallará posteriormente.

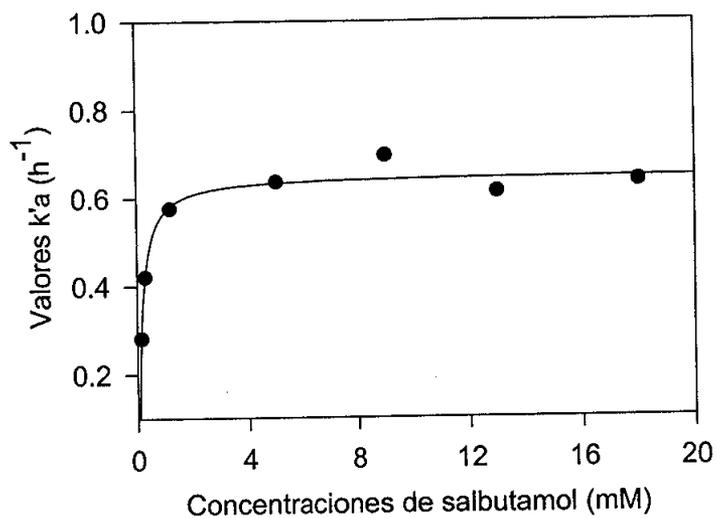


Figura 4.2 Representación gráfica de los valores de las constantes aparentes de absorción en función de las concentraciones de salbutamol.

4.4.1.2 Ensayos de inhibición

Ante la presunta existencia de un proceso de secreción no lineal del fármaco desde el enterocito hacia el lumen intestinal, se iniciaron ensayos de inhibición dirigidos a dilucidar la naturaleza del sistema portador. En estos ensayos se utilizó como concentración de referencia del fármaco, la correspondiente a la dosis alométrica en la rata, es decir, salbutamol 0.29 mM. Con ello se pretendía determinar qué repercusión podría tener la inhibición del proceso de secreción sobre la dosis que habitualmente se administra en humanos.

4.4.1.2.1 VERAPAMILO

En primer lugar se seleccionó el verapamilo (*Karlsson J. y col., 1993*), inhibidor específico del sistema secretor intestinal MDR1, también conocido como glicoproteína P.

El verapamilo es el inhibidor más utilizado en los ensayos de inhibición encaminados a determinar si una sustancia es sustrato de este sistema secretor (*Doppenschmitt S. y col., 1998; Sandstrom R. y col., 1998*). La bibliografía especializada indica que la inhibición de la glicoproteína P obedece a un proceso competitivo dosis-dependiente (*Doppenschmitt S. y col., 1999; Spahn-Langguth H. y col., 1998*).

Por ello, los ensayos de inhibición competitiva se llevaron a cabo con verapamilo 10 y 20 mM. Las concentraciones de inhibidor seleccionadas son mucho más elevadas que la de sustrato, 30 y 60 veces mayores, ya que si ambas sustancias se encontraran en el lugar de absorción en cantidades equimoleculares, la unión a la glicoproteína P vendría determinada, principalmente, por la mayor o menor afinidad de los sustratos al portador, y la inhibición competitiva, por parte del verapamilo, podría no llegar a manifestarse.

En el **Cuadro 3.41** se consignan los valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en intestino delgado de la rata al perfundir salbutamol 0.29 mM sin y con verapamilo, 10 y 20 mM, respectivamente. Como se puede observar, el salbutamol presenta un valor k_a de $(0.42 \pm 0.05) \text{ h}^{-1}$. Este valor aparente aumenta apreciablemente en presencia de verapamilo, de un orden 2.4 veces en presencia de verapamilo 10 mM $(0.98 \pm 0.08) \text{ h}^{-1}$ y de 3 veces $(1.22 \pm 0.07) \text{ h}^{-1}$ en presencia de verapamilo 20 mM.

El análisis de varianza de una vía (**Cuadro 3.42**) ha demostrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las constantes de absorción aparente de primer orden del salbutamol obtenidas en ausencia y en

presencia de concentraciones crecientes de verapamilo, lo que confirma la existencia de una inhibición dependiente de la dosis.

A la vista de los resultados, parece que al menos en parte, la glicoproteína P intestinal es un factor que limita la biodisponibilidad oral del salbutamol y que la inhibición o, de alguna manera, la interrupción de la funcionalidad intestinal de este enzima disminuye la secreción del β -agonista, aumentando el rendimiento neto de la absorción intestinal lo que, lógicamente, debería aumentar la biodisponibilidad oral del fármaco.

Según algunos autores, el verapamilo podría aumentar el diámetro de los canalículos acuosos que conforman la ruta paracelular, facilitando el paso de moléculas con peso molecular elevado (*Sakai M. y col., 1994*). Ésto, unido al efecto vasodilatador que presenta, podría alterar la integridad de la membrana intestinal, de manera que el aumento de la constante aparente de velocidad de absorción del salbutamol se debiera, al menos en parte, a estos efectos.

Para dilucidar totalmente este aspecto de la cuestión, se realizaron ensayos cinéticos con antipirina. Se seleccionó esta sustancia patrón, dado que presenta una cinética de absorción pasiva y no se secreta activamente en el intestino delgado de la rata (*Merino M y col., 1989*).

La prueba se diseñó del siguiente modo: se perfundió, en el intestino delgado de la rata, una solución de antipirina 1.33 mM y se determinó su constante aparente de velocidad de primer orden. Paralelamente, se perfundieron soluciones mixtas de antipirina, a la misma concentración, y de verapamilo 10 y 20 mM, con objeto de reproducir las condiciones en las que se ensayó el salbutamol. En el **Cuadro 3.55**, se resumen las constantes de velocidad obtenidas para la antipirina en cada una de las condiciones de ensayo. El análisis de varianza de una vía realizado con el valor de estas constantes (**Cuadro 3.56**) determinó que éstas no difieren significativamente, con lo que se puede concluir que, en nuestras condiciones de ensayo, el verapamilo no modifica la membrana celular y el aumento del valor de las constantes de velocidad de absorción del salbutamol, en presencia de verapamilo, se debe, exclusivamente, a la inhibición del proceso de secreción intestinal del fármaco.

4.4.1.2.2 AZIDA SÓDICA

La azida sódica es un conocido inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta cadena está formada por cuatro complejos protéicos, a través de los cuales pasan electrones desde potenciales estándar de reducción más bajos (más negativos) a más elevados (más positivos). El flujo de electrones es irreversible, liberándose energía que es captada en la síntesis de ATP. Los electrones se transportan desde los complejos I y II al complejo III mediante el coenzima Q (UBIQUINONA) y desde el complejo III al IV mediante la proteína periférica de membrana Citocromo C.

La producción de ATP (fosforilación oxidativa) está asociada al transporte electrónico de la cadena respiratoria. La ATP sintetasa está formada por dos unidades: F_1 y F_0 . La F_1 es la responsable de la síntesis de ATP, y la F_0 está inmersa en la membrana mitocondrial y se supone que es el conducto para los iones H^+ que se liberan de la cadena respiratoria. El nexo de unión entre la energía libre liberada en el transporte electrónico y la energía libre necesaria para la síntesis de ATP es el gradiente de iones H^+ entre el interior y el exterior de la mitocondria (espacio intermembrana) que se produce por el paso de electrones por la cadena respiratoria (teoría quimiosmótica o de Mitchell). Para sintetizar ATP se requiere el paso de 3 a 4 H^+ .

Como se ha mencionado, la azida sódica actúa a nivel del Complejo IV (citocromo C oxidasa). Por tanto, se bloquea la producción de iones H^+ que no pueden transportarse a la ATP sintetasa y, por tanto, esta enzima no tiene energía suficiente para formar ATP.

En consecuencia, la azida sódica no actúa directamente sobre los portadores secretorios intestinales, sino que lo hace indirectamente inhibiendo aquellos procesos que requieren ATP, ya que priva a la célula de su "combustible".

Por ello, a la hora de abordar el estudio cinético de inhibición del proceso secretor con este inhibidor metabólico, se asumió una ecuación diferencial que

describiera una inhibición no competitiva, es decir, aquella que modifica el valor V_m sin alterar el valor K_m del portador.

Se realizaron ensayos seleccionando tres concentraciones diferentes de inhibidor: 0.3, 3 y 6 mM.

Se seleccionó la concentración de 3 mM, ya que es aquella que se ensayó en trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio (Merino M. y col., 1989). Se utilizaron, también, una concentración superior y otra inferior. Con ello se pretendía comprobar si la inhibición metabólica, asimismo, era dependiente de la dosis.

En el **Cuadro 3.47** se consignan los valores de las constantes de absorción promedias obtenidas en intestino delgado de rata al perfundir salbutamol 0.29 mM en ausencia y en presencia de cada una de las concentraciones de azida seleccionadas. Como se observa, el valor de la constante aparente de primer orden para el salbutamol en presencia de azida sódica aumenta ligeramente al aumentar la concentración de ésta.

El análisis de varianza de una vía de los valores de las constantes obtenidas en ausencia y en presencia de inhibidor, (**Cuadro 3.48**), detectó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La prueba de Scheffe determinó que estas diferencias se encontraban entre el valor de la constante aparente del salbutamol 0.29 mM y las obtenidas en cada uno de los grupos en los que se encontraba presente el inhibidor. En cambio, no se detectaron diferencias entre las constantes aparentes de absorción del salbutamol 0.29 mM obtenidas en presencia de las tres concentraciones de azida sódica, lo que haría pensar, que el ligero aumento del valor de las constantes aparentes determinadas con cada una de las tres concentraciones de azida sódica no es lo suficientemente elevado para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

4.4.1.2.2 ZUMO DE POMELO

Los ensayos realizados con el verapamilo ponen de manifiesto que al menos la glicoproteína P intestinal está involucrada en la secreción intestinal del salbutamol.

Por ello, la modulación de este mecanismo de secreción intestinal con un inhibidor fisiológicamente inocuo sería una alternativa que podría ayudar a mejorar la absorción de fármacos con importantes pérdidas presistémicas debidas, en parte, a la glicoproteína P intestinal.

En este sentido, recientemente se ha descubierto que componentes del zumo de pomelo, por el momento de naturaleza desconocida, inhiben la funcionalidad de la glicoproteína P intestinal y/o del citocromo CYP3A4 (*Takanaga H. y col., 1998; Edwards D.J. y col., 1999; Soldner A. y col., 1999*), aumentando cuantitativamente la absorción de fármacos como la Vinblastina, Ciclosporina A, Digoxina, Fexofenadina y Losartan (*Soldner A. y col., 1999*), sustratos, todos ellos de la glicoproteína P intestinal.

Esta información condujo a la realización de ensayos de absorción intestinal del salbutamol en presencia de zumo de pomelo.

Se exprimieron pomelos para obtener el zumo. Se pesó la cantidad de fármaco necesaria para preparar la concentración de referencia 0.29 mM y se le adicionó el zumo de pomelo, diluido con agua destilada al 50%. De este modo, la solución resultante era isotónica con la sangre.

La constante de absorción obtenida para el salbutamol 0.29 mM en presencia de zumo resultó ser $0.675 \pm 0.078 \text{ h}^{-1}$. Este valor es del orden de 1.6 veces superior a la constante aparente obtenida para el salbutamol 0.29 mM. El ANOVA de una vía realizado con los dos grupos de datos, demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos (**Cuadro 3.51**).

4.4.2 Ajustado diferencial de modelos cinéticos a los datos experimentales *in situ*

Se ha procedido al ajustado diferencial considerando todas las condiciones de ensayo, es decir, con y sin inhibidores.

Este ajustado se realizó utilizando el programa informático Winnonlin1.0, el algoritmo Gauss-Newton (Levenberg y Hartley) y $1/A_{\text{teor}}^2$ como factor de ponderación.

La ecuación matemática que se ha considerado para describir la evolución de la concentración de salbutamol en lumen en función del tiempo, en ausencia de inhibidores, ha sido la *Ecuación 2.10*.

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

Los símbolos se han descrito en el *Epígrafe 2.6*. En este caso A representa, para cada concentración inicial de perfusión, las concentraciones remanentes en el lumen a los diferentes tiempos de toma de muestra, para cada uno de los 8 animales utilizados en cada ensayo. Debe puntualizarse que, en el término que corresponde a la secreción activa, A debería representar la concentración de fármaco en el enterocito. Sin embargo, este valor no se ha podido determinar con la técnica experimental utilizada y se ha asumido que es igual a la del lumen intestinal. Realmente, la concentración de fármaco en el enterocito a cada tiempo considerado es proporcional a la del lumen.

En presencia del inhibidor específico de la glicoproteína P, el verapamilo, el sistema secretor experimenta una inhibición competitiva. Este tipo de proceso se ha descrito matemáticamente mediante la *Ecuación 2.11*, que como se puede observar refleja la contribución de un factor que modifica el valor Km , aumentándolo, sin alterar el valor Vm :

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s \left[1 + \frac{I}{KmI} \right] + A} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

en la que K_a , A , Vm_s , y Km_s ya se han definido en la *Ecuación 2.10*, I es la concentración de inhibidor, que se ha considerado que permanece constante durante los 30 minutos de ensayo y KmI es la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción del inhibidor.

Como se ha comentado anteriormente, la azida sódica no inhibe directamente al sistema secretor, sino que lo hace de manera indirecta, al bloquear al Complejo IV de la cadena respiratoria, reduciendo los niveles disponibles de energía en la célula. Por ello, para describir matemáticamente este proceso, se ha asumido un modelo de inhibición de efecto indirecto.

En este modelo se ha considerado que la funcionalidad del sistema secretor disminuye como consecuencia de la reducción del ATP celular disponible y que, a su vez, esta depleción de ATP, depende de la presencia de azida sódica, como bloqueante del complejo IV de la cadena respiratoria.

Por ello, se han desglosado matemáticamente los dos procesos:

1º) Por una parte, se han establecido ecuaciones diferenciales que describen la variación de la concentración de ATP celular en función del tiempo, para cada concentración de azida ensayada.

2º) Se han empleado expresiones diferenciales que definen la evolución de la concentración remanente de salbutamol en lumen intestinal, según la concentración de ATP calculada mediante las ecuaciones diferenciales mencionadas anteriormente.

1º) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DISPONIBLE DE ATP

En ausencia de azida sódica, se asume que el ATP se forma siguiendo una cinética de orden cero y que se consume según una cinética de orden uno. De modo que se puede expresar matemáticamente de este modo:

$$\frac{dATP}{dt} = k_0 - k_{DES} \cdot [ATP] \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde k_0 es la constante de velocidad de formación del ATP de orden cero, k_{DES} es la constante de desaparición del ATP de primer orden y $[ATP]$, es la concentración de ATP a cada tiempo. El ATP se formará y se consumirá según las necesidades energéticas del organismo.

Normalizando la concentración de ATP a un valor de 1, cuando se alcance el estado estacionario, k_0 será igual a k_{DES} , como se deduce de la siguiente expresión:

$$\frac{dATP}{dt} = 0 = k_0 - k_{DES} \cdot [1] \quad \text{Ecuación 4.2}$$

La presencia de azida sódica en el medio afecta a la constante de velocidad de formación del ATP (k_0) disminuyéndola, de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{dATP}{dt} = k_0 \cdot \left(1 - \frac{AZ}{IC_{50} + AZ} \right) - k_{DES} \cdot [ATP] \quad \text{Ecuación 2.13}$$

en la que k_0 es la constante de formación del ATP, k_{DES} es igual a k_0 , AZ es la concentración de azida sódica en el medio, IC_{50} es la concentración de azida sódica que inhibe al 50% la actividad del complejo IV y $[ATP]$ es la concentración de ATP disponible en el tiempo t .

Con esta ecuación se puede determinar, a cada tiempo, cuál es la concentración de ATP de que dispone la célula.

2º) MODULACIÓN DEL SISTEMA SECRETOR SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE ATP DISPONIBLE.

De acuerdo con la concentración de ATP celular disponible, la ecuación que rige el proceso de inhibición del sistema secretor intestinal será la siguiente:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A \cdot [ATP]}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 2.12}$$

Se ha considerado que el nivel de ATP en el medio sólo afecta a la velocidad máxima del sistema secretor (Vm_s) puesto que la azida sódica, en su modo de acción, se comporta como si se tratara de un inhibidor no competitivo.

Para el zumo de pomelo, se ha considerado también una inhibición competitiva, *Ecuación 2.11*, ya que parece ser que algún componente del mismo actúa directamente sobre el sistema enzimático de secreción compitiendo con el sustrato por el sistema portador. La *Ecuación 2.11* se transforma en la siguiente:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s \cdot Pkm + A} \quad \text{Ecuación 2.14}$$

En esta ecuación, Pkm es un factor que modifica la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción del salbutamol, de acuerdo con una inhibición competitiva del proceso. En realidad, Pkm sería igual a $[1+(I/KmI)]$. En este caso, no sabemos la concentración ni el tipo de sustancia que ejerce la acción inhibitoria. Por ello, se ha asumido que el zumo de pomelo modifica la Km_s según un factor Pkm . Los demás parámetros se han descrito anteriormente.

Los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos con el ajustado diferencial de los datos se detallan en el **Cuadro 3.57**:

Parámetros	Valores estimados	Error estándar	Coefficiente de variación (%)
$k_a(h^{-1})$	1.463	0.003	11.89
$Vm_s(mM/h)$	66.90	0.501	44.96
$Km_s(mM)$	70.11	21.75	31.02
FA_0	0.787	0.005	0.59
FAE	0.855	0.012	1.44
$Km_i(mM)$	10.510	4.665	44.38
$IC_{50}(mM)$	0.270	0.679	253.38
PKM	1.30	0.091	6.96
$k_0(mM/h)$	0.45	0.003	43.47
SC	2.342		
AIC	549.022		
r	0.997		

Los parámetros cinéticos calculados ponen de manifiesto que el modelo seleccionado es el que mejor satisface los datos experimentales, ya que presentan una varianza residual muy buena. Modelos más sencillos y más complejos no mejoraron el ajuste. Concluyendo, el proceso de incorporación del salbutamol al organismo se puede desglosar en un proceso pasivo de entrada junto con un proceso de secreción activa desde las células absorbentes hacia el lumen intestinal.

El proceso de secreción se caracteriza por su baja afinidad ($Km_s = 70$ mM) y moderada capacidad ($Vm_s = 66.9$ mM/h). Estas características determinan que, aún cuando la concentración de fármaco en lumen intestinal sea muy pequeña, las

constantes de absorción aparentes adquieran una magnitud que no se puede considerar despreciable ($0.3-0.4 \text{ h}^{-1}$).

La constante de absorción aparente (k'_a) viene determinada por la *Ecuación 4.3* (*Epígrafe 4.4.1.1*):

$$k'_a = k_a - \frac{Vm_s}{Km_s + A} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

La constante de absorción, en la asíntota, tiene un valor de 1.463 h^{-1} , que corresponde, teóricamente, al que presentaría en ausencia de procesos de secreción enterocito-lumen. El componente activo de secreción, que determina una variación aparente en el valor k_a , es dependiente de la concentración (*Ecuación 4.3*), de manera que al administrar a la rata la dosis alométrica (0.29 mM), la constante de absorción aparente disminuye su valor alrededor de un 70%.

Puesto que la concentración de salbutamol más elevada que se ha perfundido (18 mM) no ha alcanzado el valor de la Km_s , se puede afirmar que, en el ámbito de concentraciones ensayadas, la secreción intestinal del salbutamol funciona plenamente aunque, al presentar una capacidad moderada, se determinen constantes de absorción aparentes de cierta magnitud.

Demostrada la existencia de un proceso de secreción mediado por portadores, se procedió, a continuación, al estudio de inhibición del mismo empleando distintos tipos de inhibidores que permitieran esclarecer la naturaleza del sistema secretor.

En primer lugar se utilizó el verapamilo. El buen ajustado de los datos experimentales confirman que dicha sustancia tiene mayor afinidad que el salbutamol por el portador ($Km_I = 10.5$ frente a $Km_s = 70.11$). Además, inhibe intensamente el proceso de secreción. De hecho, cuando se perfunde a la concentración de 10 mM , el sistema secretor funciona al 50% de su capacidad y cuando interviene a la concentración 20 mM , la funcionalidad de la proteína secretora es tan sólo del 30%.

El modelo cinético seleccionado también resulta adecuado para describir la acción de la azida sódica sobre el complejo secretor.

TIEMPO (minutos)	[ATP] en presencia de azida sódica 0.3 mM	[ATP] en presencia de azida sódica 3 mM	[ATP] en presencia de azida sódica 6 mM
5	1	1	1
10	0.962	0.934	0.931
15	0.944	0.902	0.898
20	0.926	0.872	0.866
25	0.909	0.843	0.836
30	0.894	0.815	0.807

Como se puede observar en este cuadro, en los treinta minutos que dura el ensayo de absorción, la síntesis de ATP se reduce, en presencia de azida sódica 0.3 mM, un 11%, con azida 3 mM un 19% y con la concentración 6 mM un 20%. No obstante, la depleción de ATP no llega a ser suficiente para reducir de forma importante el valor de la Vm_s y, con ello, el valor de la constante de absorción aparente. Por ello, en presencia del inhibidor metabólico, la k'_a aumenta ligeramente de forma dosis-dependiente, pero este aumento no llega a ser suficiente como para detectar diferencias estadísticamente significativas. Probablemente, si el ensayo pudiera prolongarse más allá de 30 minutos, la depleción de ATP sería ya de un orden que permitiría conseguir tal efecto.

En presencia de zumo de pomelo, se ha cuantificado un factor que consigue modificar el valor Km_s , aumentándolo 1.3 veces. Ante este resultado sólo se puede afirmar que, en nuestras condiciones experimentales, el zumo actúa como un inhibidor competitivo moderado del sistema secretor, aunque no se sabe exactamente que sustancia/s son las responsables de la inhibición del proceso.

En consecuencia, una pauta posológica adecuada podría ser la administración simultánea del zumo de pomelo con el salbutamol. Este es un aspecto que debe tenerse en cuenta para su posterior estudio. En teoría, sin embargo, podría favorecer la absorción de formas convencionales de salbutamol de cesión rápida pero no resultaría útil en el caso de formas orales sostenidas.

4.4.3 Absorción intestinal del salbutamol en diferentes tramos intestinales

Cuando se realizan ensayos de absorción de un fármaco en distintos tramos intestinales, se tiene por objeto determinar si existe o no una zona de absorción preferente.

Aplicando un razonamiento similar se ha pensado que el/o los sistemas activos implicados en la secreción intestinal del salbutamol podrían localizarse, preferentemente, en una zona determinada del tracto gastrointestinal.

Por ello, se procedió a la perfusión de la solución de salbutamol 0.29 mM en los tramos proximal, medio, distal y colon del intestino delgado de la rata. Las constantes aparentes de velocidad obtenidas en cada uno de estos tramos fueron, respectivamente: $(0.469 \pm 0.050) \text{ h}^{-1}$; $(0.344 \pm 0.015) \text{ h}^{-1}$; $(0.327 \pm 0.024) \text{ h}^{-1}$ y $(0.499 \pm 0.055) \text{ h}^{-1}$. Como se observa, el valor de la constante de absorción del salbutamol en colon fue mayor que en los demás tramos y en el tramo distal el valor obtenido fue el más bajo. Esto podría deberse al diferente grado de expresión del sistema secretor en cada tramo intestinal.

A la vista de estos resultados, se creyó conveniente realizar ensayos con soluciones mixtas de salbutamol y verapamilo. Como el lugar de absorción por excelencia es el intestino delgado, se decidió realizar ensayos comparativos de absorción únicamente en este tracto, sin incluir el colon. De los tres tramos restantes, se eligieron los tramos proximal y distal, puesto que los valores de las constantes de absorción son los que más difieren entre sí. En ambos tramos se perfundieron soluciones de salbutamol 0.29 mM en presencia de verapamilo 10 mM. Las constantes aparentes de velocidad de absorción obtenidas fueron (0.471 ± 0.051)

h^{-1} para el tramo proximal, es decir, del mismo orden que la obtenida con salbutamol solo, y $(0.734 \pm 0.093) h^{-1}$ para el distal, 2.24 veces superior a la obtenida en ausencia de inhibidor. En intestino delgado completo, la presencia de verapamilo produjo un aumento de 2.35 veces en el valor de la constante, es decir, del mismo orden que el observado en el tramo distal. Según estos resultados, se puede sospechar una mayor expresión del sistema secretor en el tramo distal del intestino delgado de la rata, aspecto que se intentó esclarecer mediante ensayos biomoleculares, que se comentan más adelante.

4.5 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DEL SALBUTAMOL EN CULTIVOS CELULARES

En esta Memoria se concluye que en el intestino delgado de rata, la incorporación del salbutamol al organismo viene definida por un proceso pasivo de entrada junto con un proceso de secreción activa desde las células absorbentes hacia el lumen intestinal.

Los modelos celulares se emplearon con objeto de confirmar los resultados obtenidos con las técnicas *in situ* y establecer, a su vez, si estas líneas celulares constituían una técnica complementaria de los ensayos efectuados con animales.

En los últimos tiempos existe una tendencia a disponer de técnicas alternativas que permitan reducir la experimentación animal. No obstante, a nuestro modo de ver, no se puede prescindir totalmente de los estudios con animales, ya que constituyen el único modelo que reproduce fielmente los procesos fisiológicos que intervienen en la absorción gastrointestinal.

En los ensayos *in vitro* se consideró oportuno utilizar el mismo ámbito de concentraciones que el seleccionado en los ensayos *in situ*, pero no fue posible. Ello se debe a que la monocapa celular es más sensible a la toxicidad intrínseca de los compuestos químicos que la membrana intestinal íntegra. En consecuencia, concentraciones de salbutamol, verapamilo o probenecid superiores a la $100 \mu M$ alteraban la integridad de la membrana, con lo que los valores de P_{ef} evaluados, en

ban la integridad de la membrana, con lo que los valores de P_{ef} evaluados, en esas condiciones, se hubieran falseado por exceso. Esta misma toxicidad ha determinado que el zumo de pomelo se ensayara diluido en una tercera parte.

En los **Cuadros 3.67** y **3.68** se consignan las P_{ef} (cm/seg) determinadas, en Caco-2 TC7, para el salbutamol en las diferentes condiciones de ensayo.

El cociente entre las permeabilidades basal-apical y apical-basal (P_{BA}/P_{AB}) proporciona información sobre el mecanismo implicado en el transporte transmembrana.

Si P_{BA}/P_{AB} tiene un valor próximo a la unidad, la permeabilidad en ambos sentidos es de la misma magnitud y se considera que el fármaco se transporta únicamente por difusión pasiva.

Si P_{BA}/P_{AB} tiene un valor superior a la unidad, el fármaco atraviesa la membrana a mayor velocidad en el sentido basolateral-apical. Si se supone que el recorrido difusional es el mismo, puede deducirse la existencia de un transportador que funciona con o sin aporte energético y que actúa en sentido basolateral-apical.

Si P_{BA}/P_{AB} tiene un valor inferior a la unidad, se puede suponer la existencia de un transportador en el sentido apical-basolateral.

Como se muestra en el **Cuadro 3.69**, el valor del cociente obtenido, en Caco-2 TC7, para el salbutamol 100 μ M es de 1.86. De acuerdo con lo expuesto, la velocidad del transporte basal-apical prevalece sobre la que existe en sentido inverso y se puede concluir la existencia de un proceso de secreción basolateral-apical o, lo que es lo mismo, enterocito-lumen.

Del mismo modo, la adición de verapamilo a la solución de ensayo provoca un aumento de la P_{AB} y una disminución de la P_{BA} . En este caso, P_{BA}/P_{AB} pasa de tener un valor de 1.86, en ausencia de inhibidor, a un valor de 0.67, en presencia del mismo, con lo que se puede afirmar que se ha producido un bloqueo de la secreción del salbutamol, atribuida, al menos en parte, a la glicoproteína P.

Recientemente se han descrito, en el intestino, sistemas secretores de naturaleza diversa, entre ellos el sistema MRP. Por ello, se consideró apropiado comprobar si este sistema contribuía, también, en la secreción del salbutamol. Se procedió a la inhibición de la proteína secretora mediante el empleo de probenecid, inhibidor específico del sistema MRP.

En los **Cuadros 3.67** y **3.68** se puede observar como el probenecid ejerce sobre la P_{ef} del salbutamol un efecto similar al efectuado por el verapamilo. Como se observa en el **Cuadro 3.69**, el valor P_{BA}/P_{AB} en ausencia de inhibidor tiene un valor de 1.86, mientras que al adicionar probenecid, este cociente P_{BA}/P_{AB} es 0.41. Por ello, se puede establecer que el sistema MRP está implicado en la secreción activa del salbutamol, y que su participación parece ser de la misma magnitud que la de la glicoproteína P.

Por último, se debe comentar que la contribución del zumo de pomelo, como inhibidor de la secreción activa, también ha quedado patente en este modelo celular (**Cuadro 3.67**). Sólo se dispone del valor de la permeabilidad en sentido apical-basolateral debido a la gran toxicidad que ha demostrado tener el zumo de pomelo sobre la cara basolateral de la monocapa celular. Se ha podido comprobar experimentalmente que, en general, las soluciones de ensayo son más tóxicas cuando se encuentran en el compartimento basolateral. Esto se debe a que las células no tienen ningún tipo de protección, como pueden ser los villis, que sí existen en el compartimento apical.

En presencia de zumo de pomelo, el salbutamol $100 \mu\text{M}$, aumenta su P_{AB} alrededor de 2.25 veces. Puede deducirse que componentes presentes en el zumo de pomelo bloquean de alguna manera los portadores que secretan activamente al salbutamol.

En la **Figura 3.20** se muestra, mediante un histograma de barras, las permeabilidades promedias, con su desviación estándar, obtenidas en cada tipo de ensayo. Como se observa, el valor de P_{AB} para el salbutamol aumenta al adicionar

los inhibidores y, en cambio, la permeabilidad en el sentido contrario (P_{BA}) disminuye en presencia de los mismos. Por ello, se puede afirmar que en el proceso de secreción activa del salbutamol están implicados, al menos entre otros, la glicoproteína P y el sistema MRP.

Los ensayos realizados con células MDCK, se plantearon con objeto de comparar ambos modelos celulares. En la literatura se ha descrito que las células MDCK constituyen un modelo adecuado para la predicción de la permeabilidad de fármacos, alternativo a las Caco-2, sobre todo para fármacos que se absorben por difusión pasiva.

Como se muestra en el **Cuadro 3.72**, el valor del cociente P_{BA}/P_{AB} obtenido, en MDCK, para el salbutamol 100 μ M es de 1.72. De acuerdo con lo expuesto previamente, la velocidad del transporte basal-apical prevalece sobre la que existe en sentido contrario y se puede concluir que existe un proceso de secreción en dirección basolateral-apical o, lo que es lo mismo, enterocito-lumen.

Del mismo modo, la adición de verapamilo a la solución de ensayo produce un aumento de la P_{AB} y una disminución de la P_{BA} . En este caso, P_{BA}/P_{AB} pasa de tener un valor de 1.72, en ausencia de inhibidor, a un valor de 0.74, en presencia del mismo, con lo que se puede afirmar que se ha producido un bloqueo de la secreción del salbutamol, atribuida, al menos en parte, a la glicoproteína P.

Si comparamos los valores de los cocientes obtenidos en las células MDCK con los obtenidos en las Caco-2 TC7, puede considerarse del mismo orden. Por ello, puede decirse que, al menos para fármacos que se absorben pasivamente, las células MDCK pueden utilizarse como alternativa a las Caco-2 TC7, a pesar de su origen renal y no intestinal. Esto constituye una gran ventaja, ya que permite iniciar los ensayos entre 5 y 10 días tras la siembra de las células en los filtros, lo que permite reducir los costes de los ensayos celulares.

En resumen, los resultados *in vitro* corroboran los obtenidos en los ensayos de absorción *in situ* realizados en la rata.

4.6 ENSAYOS BIOMOLECULARES: Grado de expresión del RNA mensajero del gen MDR en diferentes tejidos de la rata.

Las investigaciones recientes sobre la distribución de la glicoproteína P a lo largo del tracto gastrointestinal no parecen resultar concluyentes. En algunos trabajos se afirma que la glicoproteína P se localiza preferentemente en la zona proximal del intestino delgado (*Sánchez-Castaño G. y col., 2000*), en otros se indica que se concentra sobre todo en el colon (*Ficker y col., 1996*), y en otras publicaciones, se concluye que la mayor expresión se produce en el tramo distal (*Saitoh H. y col., 1997; Nakayama A. y col., 1999; Chianale J. y col., 1995*).

Para determinar de una manera semicuantitativa la cantidad de RNA mensajero del gen MDR presente en cada uno de los tejidos seleccionados (tramo proximal, medio, distal, colon, estómago, mucosa bucal y pulmón), se ha utilizado la técnica RT-PCR, descrita ampliamente en el Capítulo 1 de la presente Memoria. Estos ensayos se han realizado bajo la supervisión del Dr. Domingo Baretino (Instituto de Biomedicina. CSIC. Valencia).

Como puede verse en la **Figura 3.22**, la expresión del RNA mensajero difiere en los tejidos analizados. De acuerdo con estos resultados, los mayores niveles del gen MDR se observan en el tramo distal del intestino delgado de la rata.

Tomando como referencia el tramo proximal (segmento del intestino delgado que presenta menor grado de expresión), al comparar los niveles obtenidos en cada uno de los tejidos con el de referencia, se puede observar que:

- * en colon resultan ser del mismo orden
- * en el tramo medio son alrededor de dos veces mayores
- * en la mucosa bucal unas cuatro veces mayores
- * en pulmón unas 16 veces mayores

- * en el tramo distal alrededor de 32 veces superiores
- * en estómago los niveles han sido prácticamente indetectables

En la figura se ilustra, también, la amplificación del patrón interno, la ciclofilina, que ha sido equivalente en todos los tejidos analizados. Esto indica que realmente las diferencias obtenidas en cada uno de los tejidos analizados se deben a la mayor expresión del gen MDR y no a irregularidades en el funcionamiento de la técnica RT-PCR.

Los resultados procedentes de los ensayos de absorción, realizados en esta Memoria, indican que la secuencia de los valores de las constantes de absorción del salbutamol 0.29 mM, en orden decreciente es la siguiente:

Colon \cong Proximal > Medio > Distal

En cambio, la expresión del RNA mensajero del gen MDR ha seguido la siguiente secuencia:

Distal > Medio > Colon \cong Proximal

En consecuencia, existe una excelente correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos de absorción *in situ* con los niveles de expresión del RNA mensajero del gen MDR determinados en esta Memoria. Allí donde se observa la expresión mayoritaria del gen MDR, se determinan los valores menores de constante de absorción.

Capítulo 5

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Ensayos previos realizados en nuestro departamento con salbutamol, pusieron de manifiesto que tras la administración oral a la rata de salbutamol 0.29 mM, los niveles plasmáticos alcanzados eran más bajos que los previstos teóricamente, lo que hizo pensar en un proceso de secreción oral del fármaco, paralelo al de absorción. En consecuencia, se diseñó un protocolo de ensayos que permitiera profundizar en el conocimiento de los factores que modulan la incorporación del salbutamol al organismo tras su administración oral. Para ello se utilizaron distintas técnicas experimentales: perfusión *in situ* en animales, estudios difusionales en cultivos celulares y determinación del grado de expresión del gen MDR (portador de secreción intestinal) mediante biología molecular.

Se han determinado las constantes aparentes de velocidad de absorción en intestino completo de rata de siete concentraciones diferentes de salbutamol, a fin de detectar la linealidad o no linealidad en su absorción.

Con salbutamol 0.29 mM (dosis alométrica) se han realizado, en intestino delgado completo de la rata, ensayos de inhibición de sistemas activos de secreción intestinal. Se han utilizado el verapamilo, la azida sódica y el zumo de pomelo.

También se ha estudiado la constante de velocidad de absorción *in situ* del salbutamol 0.29 mM, sólo y en presencia de verapamilo, en diferentes tramos del intestino delgado de la rata, a fin de establecer diferencias regionales de expresión del sistema secretor. Paralelamente, se ha analizado la expresión del gen MDR en diferentes tejidos, entre los que se encuentran dichos tramos intestinales, con el fin de comprobar si existe una correlación con los resultados obtenidos *in situ*.

En los estudios de absorción *in vitro* se ha determinado la permeabilidad del salbutamol en monocapas celulares de Caco2-TC7 y MDCK en condiciones similares a las utilizadas para los estudios *in situ*.

Del trabajo realizado se han extraído como más relevantes, las siguientes conclusiones:

1ª) La técnica de valoración utilizada para el salbutamol es plenamente satisfactoria dentro del ámbito de concentraciones ensayadas y justifica su empleo para el fin propuesto.

2ª) Las constantes aparentes de velocidad de absorción del salbutamol en intestino de rata determinadas en esta Memoria son plenamente representativas del proceso de absorción del fármaco y no están modificadas por fenómenos de degradación del mismo.

3ª) La incorporación del salbutamol al organismo es dosis dependiente y viene definida por un proceso pasivo de entrada, simultáneo a un proceso de secreción activa desde las células absorbentes hacia el lumen intestinal.

El proceso de secreción se caracteriza por su baja afinidad y moderada capacidad, lo que implica que aún cuando la concentración de fármaco en el lumen intestinal sea muy pequeña, los valores de las constantes de absorción aparentes no sean despreciables.

4ª) El proceso de secreción del salbutamol desde el enterocito al lumen se inhibe competitivamente por el verapamilo lo que indica que, al menos en parte se halla mediatizado por la glicoproteína P.

5ª) La azida sódica aumenta ligeramente, de forma dosis-dependiente, los valores de las constantes de absorción del salbutamol, lo que indica que la secreción del fármaco es energía-dependiente. El hecho de que las constantes no difieran significativamente entre sí se atribuye a que la depleción de ATP no puede manifestarse adecuadamente en sólo 30 minutos.

6ª) El zumo de pomelo actúa como un inhibidor competitivo del sistema secretor. El efecto determinado es sólo cualitativo puesto que se desconoce qué sustancia/s son las responsables de la inhibición del proceso y su concentración en la solución de perfusión.

7ª) Tanto en células Caco2-TC7 como en las células MDCK, el cociente P_{BA}/P_{AB} es mayor que la unidad, lo que indica la existencia de transportadores que actúan en sentido basolateral-apical. En presencia de inhibido-

res específicos de los sistemas de secreción MDR y MRP, la reducción del valor del cociente ha sido semejante, por lo que se puede concluir que ambos sistemas están implicados por igual en el proceso de secreción activa del salbutamol.

Las células MDCK pueden utilizarse como alternativa de las Caco2-TC7, a pesar de su origen renal y no intestinal, al menos para fármacos que se absorben pasivamente, presentando la ventaja frente a la células Caco-2 de permitir iniciar antes los ensayos, lo que determina una reducción en tiempo y costes.

8ª) La excelente correlación entre los ensayos de absorción in situ en los tramos intestinales y los niveles de expresión del RNA mensajero del gen MDR, determinados mediante RT-PCR, permiten concluir que la glicoproteína P se localiza preferentemente en el tramo distal del intestino delgado de la rata.

9ª) Para la administración oral del salbutamol sería conveniente adicionar un inhibidor específico de la glicoproteína P, que sea a su vez inocuo para el organismo, como podría ser la administración simultánea de zumo de pomelo, para evitar, de esta manera, la baja absorción del fármaco y poder obtener niveles plasmáticos que aseguren una respuesta terapéutica adecuada. También podría resultar adecuada una vía de administración alternativa que permitiera obviar los efectos de primer paso descritos.

BIBLIOGRAFÍA

American Hospital Formulary Service

12:12 Sympathomimetic (Adrenergic) Agents Albuterol Sulfate, 1016-1021.

Drugs Information American Society of Hospital Pharmacist, Bethesda, (1998).

Ariens E.J.

Drug Design.

Med. Chem. A series of monographs 11-V: 81-82 (1975).

Artursson P.

Epithelial transport of drugs in cell culture. I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorption (Caco-2) cells.

J. Pharm. Sci. 79: 880-885 (1990).

Artursson P., Karlsson J.

Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 175: 880-885 (1991).

Artursson P., Palm K., Luthman K.

Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport.

Adv. Drug Delivery Rev. 22: 67-84 (1996).

Aungst B.J., Saitoh H.

Intestinal absorption barriers and transport mechanisms, including secretory transport, for a cyclic peptide, fibrinogen antagonist.

Pharm. Res. 13(1): 114-119 (1996).

Aungst B.J., Saitoh H., Gerard C.

The secretory intestinal transport of some beta-lactam antibiotics and anionic compounds: a mechanism contributing to poor oral absorption.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 278: 205-211 (1996).

Ballard S.T., Hunter J.H., Taylor A.E.

Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium.

Ann. Rev. Nutrition **15**: 35-55 (1995).

Barthe L., Bessouet M., Woodley J.F., Houin G.

The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein.

Int. J. Pharmaceut. **173(1-2)**: 255-258 (1998).

Bates T.R., Gibaldi M.

Gastrointestinal absorption of drugs. En "Biopharmaceutics".

Lea and Febiger. Filadelfia. 55-99 (1970).

Bellamy W.T.

P-glycoprotein and multidrug resistance.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **36**: 161-183 (1996).

Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J.

The multidrug resistance protein family.

Biochimica et Biophysica Acta. **1461**: 347-357 (1999).

Boulton D.W., Fawcett J.P.

Enantioselective disposition of salbutamol in man following oral administration.

Br. J. Clin. Pharmacol. **41(1)**: 35-40 (1996).

Caro I., Boulenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrié M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., Fabre G.

Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs.

International Journal of Pharmaceutics **116**: 147-158 (1995).

Castaña García T., Ruiz Rubio L., Vidal Aliaga J. L.

Monografías Farmacéuticas, 1998.

Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante.

Chantret I., Barbat A., Dussaulx E., Brattain M.G., Zweibaum A.

Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultures human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines.

Cancer Res. **48(7)**: 1936-1942 (1998).

Chianale J., Vollrath V., Wielandt A.M., Miranda S., Gonzalez R., Fresno A.M., Gonzalez S., Andrade L., Guzman S.

Differences between nuclear run-off and mRNA levels for multidrug resistance gene expression in the cephalocaudal axis of the mouse.

Biochim Biophys Acta **1264(3)**: 369-376 (1995).

Cho M., Thompson D.P., Cramer C.T., Vidmar T.J., Scieszka I.F.

The Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier.

Pharm. Res. **6**: 71-77 (1989).

Cho M., Adson A., Kezdy F.J.

Transepithelial transport of aliphatic carboxylic acids studied in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell monolayers.

Pharm. Res. **7**: 325-331 (1990).

Chomczynski P., Sacchi N.

Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.

Anal. Biochem. **162**: 156-159 (1987).

Clark B.J., Gordon-Smith J., McPhate G., Clark G., Lipwoth B.J.

Lung bioavailability of generic and innovator Salbutamol metered dose inhalers.

Thorax **51(3)**: 325-326 (1996).

Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M.V., Deeley G.R.

Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance human lung cancer cell line.

Science **258**:1650-1654 (1992)

Danielson P.E., Forss-Petter S., Brow M.A., Calavetta L., Douglass J., Milner R.J., Sutcliffe J.G.

p1B15: A cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin.

DNA **7**:261-267 (1988).

Dawson H.

The permeability of natural membranes.

Cambridge University Press. Cambridge. 1-84 (1943).

Debenham P.G., Kartner N., Siminovitch L., Riordan J.R., Ling V.

DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression.

Moll. Cell. Biol. **2(8)**: 881-889 (1982).

Delie F., Rubas W.

A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model.

Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. **14**: 221-286 (1997).

Demnati R., Michoud M.C., Jeanneret G.A., Ong H.

Plasma concentrations and effects of salbutamol administered orally to patients with cystic fibrosis.

Br. J. Clin. Pharmacol. **40(4)**: 319-324 (1995).

Doluisio J.T., Billups N.F., Ditter L.W., Sugita E.T. Swintosky J.V.

Drugs absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates.

J. Pharm. Sci. **58**: 1196-1199 (1969).

Doluisio J.T., Crouthamel W.G., Tan G.H., Swintosky J.V., Ditter L.W.

Drug absorption III. Effect of membrane storage on the kinetics of drug absorption.

J. Pharm. Sci. **59**: 72-76 (1970).

Doppenschmitt S., Spahn-Langguth H., Regardh C.G., Langguth P.

Radioligand-binding assay employing P-glycoprotein-overexpressing cells: Testing drug affinities to the secretory intestinal multidrug transporter.

Pharm. Res. **15(7)**: 1001-1006 (1998).

Doppenschmitt S., Langguth P., Regard C.G., Andersson T.B., Hilgendorf C., Spahn-Langguth H.

Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: Development of a [³H]verapamil radioligand-binding assay.

J. Pharmacol. Exp. Ther., **288(1)**: 348-357 (1999).

Dulbecco R., Okada S.

Differentiation and morphogenesis of mammary cells *in vitro*.

Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **208 (1173)**: 399-408 (1980).

Eagling V.A., Profit L., Back D.J.

Inhibition of the CYP3A4-mediated metabolism and p-glycoprotein-mediated transport of the HIV-I protease inhibitor saquinavir by grapefruit juice components.
J. Clin. Pharmacol. **48**: 543-552 (1999).

Eaton E.A., Walle U.K., Wilson H.M., Aberg G., Walle T.

Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells
Br. J. Clin. Pharmacol. **41(3)**: 201-206 (1996).

Edwards D.J., Fitzsimmons M.E., Schuetz E.G., Yasuda K., Ducharme M.P., Warbasse L.H., Woster P.M., Schuetz J.D., Watkins P.

6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein.
Clin. Pharmacol. Ther. **65(3)**: 237-244 (1999).

Estrada E., Hernández M.

Cinética del transporte a través de membranas.
H.M. Blume (ed). Madrid (1976).

Farmacopea Europea

Publicaciones, Documentación y Biblioteca del Ministerio de Sanidad y Consumo.
Volumen 7, parte II (1991).

Ferruzza S., Ranaldi G., Di-Girolamo M., Sambuy Y.

The transport of lysine across monolayers of human intestinal cells (Caco-2) depends on Na(+)-dependent and Na(+)-independent mechanisms on different plasma membrane domains.
J. Nutr. **125(10)**: 2577-2585 (1995).

Ficker G., Drewe J., Huwyler J., Gutmann H., Beglinger C.

Relevance of P-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation.

Br J Pharmacol **118(7)**: 1841-1847 (1996).

Flens M.J., Zaman G.J.R., Van der Valk P., Izquierdo M.A., Schroeijers A.B., Scheffer G.L., de Haas M., Meijer C.J.L.M., Sheper R.J.

Tissue distribution of the multidrug resistance-associated protein.

Am. J. Pathol. **148**:1237-1247(1996).

Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A.

Farmacología humana.

Ed. Masson, 3ª edición, 1997.

Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T.

One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.

J. Natl. Cancer Inst. **59**: 221-226 (1977).

Foradada A., Riera P., Martín-Villodre A., Plá-Delfina J.M.

Absorción intestinal *in situ* de medicamentos.

Cienc. Ind. Farm. **6**: 300-317 (1974).

Freshney R.I.

Animal Cell Culture. A practical approach.

IRL Press Ltd. Oxford 73-77 (1986).

Gabús Sannié C., Buri P.

Étude comparative des méthodes de détermination du volume d'eau absorbé lors de perfusion de l'intestine grêle du rat.

S.T.P. Pharma. **3, 11**: 856-860 (1987).

Gant T.W., Silverman J.A., Bisgaard H.C., Burt R.K., Marino P.A., Thorgeirsson S.S.

Regulation of 2-acetylaminofluorene and 3-methylcholanthrene mediated induction of multidrug resistance and cytochrome P-450 1A gene family expression in primary hepatocyte cultures and rat liver.

Mol. Carcin. **4**: 499-459 (1991).

Gatmaitan Z.C., Arias M.

Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine.

Advantages in pharmacology **24**:77-91 (1993).

Goldstein D.A., Tan Y.K., Soldin S.J.

Pharmacokinetics and absolute bioavailability of Salbutamol in healthy adult volunteers.

Eur. J. Clin. Pharmacol. **32(6)**: 631-634 (1987).

Grasset E., Bernareu J., Pinto M.

Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2.

Am. J. Physiol. **248**: C410-C418 (1985).

Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T.

Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.

Gastroenterology **96**: 736-749 (1989).

Higgins C.F.

ABC transporters. from microorganisms to multidrug efflux systems.

Microbiol. Rev. **60**:575-608 (1992).

Hill B.T., Deuchars K.L., Hosking L.K., Ling V., Whelan R.D.

Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cells lines after fractionated X-irradiation in vitro.

J. Natl. Cancer Inst. **82**: 607-612 (1990).

Hindle M., Chrystyn H.

Determination of the relative bioavailability of Salbutamol to the the lung following inhalation.

Br. J. Clin. Pharmacol. **34(4)**: 311-315 (1992).

Hochhaus G., Mollmann H.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic characteristics of the beta-2-agonists terbutaline, salbutamol and fenoterol.

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. **30(9)**: 342-362 (1992).

Horio M., Chin K.V., Currier S.J., Goldenberb S., Williams C., Pastan I., Gottesman M.M., Handler J.

Transepithelial transport of drugs by the mutidrug transporter in cultured Madin-Darby Canine kidney cell epithelia.

J. Biol. Chem. **264**: 14880-14884 (1989).

Hunter J., Hirst H., Sommons N.L.

Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretary drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers.

Pharm. Res. **10**: 743-749 (1993).

Hutching M.J., Paull J. D., Wilson E.E., Morgan D.J.

Pharmacokinetics and metabolism of Salbutamol in premature labour.

Br. J. Clin. Pharmacol. **24(1)**: 69-75 (1987).

Irvine J.D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J.W., Selick H.E., Grove J.R.

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening.

J. Pharm. Sci. **88(1)**: 28-33 (1999).

Jakoby W., Pastan I.

Methods in enzymology. **58**: 314-449 (1979).

Johnson L.R., Christensen J., Jacobson E.D., Jackson M.J., Walsh J.H.

Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd ed.

L.R. Johnson (ed). Raven Press. Nueva York. Vol. II (1987).

Karlsson J., Shiu-Ming K., Ziemniak J., Artursson P.

Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein.

Br. J. Pharmacol. **110**: 1009-10016 (1993).

Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Van Ejik M.J.T., Jujin J.A., Baas F., Borst P.

Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologs of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1) in human cancer cell lines.

Cancer Res. **57**: 3537-3547 (1997).

König J., Rost D., Cui Y., Keppler D.

Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane.

Hepatology **29**: 1156-1163 (1999).

Kool M., Van der Linden M., de Haas M., Baas F., Borst P.

Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cell.

Cancer Res. **59**: 175-182 (1999).

Kruse P., Patterson M.

Tissue culture methods and applications.

Academic Press, New York, 471 (1973).

Kuo S.M., Whitby B.R., Artursson P., Ziemniak J.A.

The contribution of intestinal secretion to the dose-dependent absorption of celiprolol.

Pharm. Res. **11(5)**: 648-653 (1994).

Kurosawa N., Owada E., Kato A., Bando K., Ito K., Kurosawa S.

Serum concentration and cardiovascular effects of Salbutamol after oral and rectal administration in healthy volunteers.

J. Clin. Pharm. Ther. **18(2)**: 103-108 (1993).

Lee K., Belinsky M.G., Bell D.W., Testa J.R., Kruh G.D.

Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter.

Cancer Res. **58**: 2741-2747 (1998).

Lever J.E.

Inducers of mammalian cell differentiation stimulate dome formation in a differentiated kidney epithelial cell line (MDCK).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76(3)**: 1323-1327 (1979).

Litter M.

Farmacología experimental y clínica.

Ed. Ateneo, 7ª edición, 1986.

Lippert H.

Anatomía. Estructura y morfología del cuerpo humano.

Ed. Marbán, S.L. Capítulo 5 pp: 415-416, 4ª edición, (2000).

Lipwoth B.J., Clark R.A., Dhillon D.P., Charter M.K., Palmer J.B., McDevitt D.G.

Single dose and steady- state pharmacokinetics of 4 mg and 8 mg oral Salbutamol controlled-release in patients with bronchial asthma.

Eur. J. Clin. Pharmacol. 37(1): 49-52 (1989).

Makney V.D., Guo A.L., Norris D.A., Hu P.D., Yan J.S., Sinko P.J.

Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells.

Pharm. Res. 15(8): 1160-1167 (1998).

Martindale.

The Extra Pharmacopeia.

Pharmaceutical Press 30ª Edition (1993).

Martín Villodre A., Plá Delfina J.M., Moreno J., Pérez Buendía M.D., Miralles Mir J., Collado E.F., Sánchez Moyano E., Del Pozo A.

Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I.

Ring-substituted anilines.

J.Pharmacokin. Biopharm. 14: 615-633 (1986).

Masuda M., Fizuka Y., Yamazaki M., Nishigaki R., Kato Y., Ni'inuma K., Suzuki H., Sugiyama Y..

Metotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats.

Cancer Res. **57**:3506-3510.

Merino M., Peris Ribera J.E., Torres Molina F., Sánchez Picó A., Martín Villodre A., Plá Delfina J.M.

Evidence of a specialized transport mechanism for the intestinal absorption of baclofen.

Biopharm. Drug Dispos. **10**: 279-297 (1989).

Morgan D.J., Paull J.D., Richmond B.H., Wilson E.E., Ziccone S.P.

Pharmacokinetics of intravenous and oral Salbutamol and its sulphate conjugate.

Br.J. Clin. Pharmacol. **22(5)**: 587-593 (1986).

Nakayama A., Eguchi O., Hatakeyama M., Saitoh H., Takada M.

Different absorption behaviors among steroid hormones due to possible interaction with P-glycoprotein in the rat small intestine.

Biol. Pharm. Bull. **22(5)**: 535-538 (1999).

Nandakumaran M., Gardey C.L., Challier J.C., Richard M.O., Panigel M.

Transfer of salbutamol in the human placenta in vitro.

Development Pharmacology and Therapeutics **3**: 88-98 (1981).

Neutra M, Louvard D.

Differentiation of intestinal cells in vitro.

Mod. Cell. Biol. **8**: 363-398 (1989).

Pacifici G.M., Giulianetti B., Quilici M.C., Spisni R., Nervi M., Giuliani L., Gomeni R.

Salbutamol sulphation in the human liver and duodenal mucosa: interindividual variability.

Xenobiotica **27(3)**: 279-286 (1997).

Peris Ribera J.E y Plá Delfina J.M.

Biodisponibilidad oral y comparada del diclofenaco: estudios en animales.

Rev. Farmacol. Clín Exp. **2**: 37-46 (1986).

Perreault S., Ong H.

Salbutamol disposition and dynamics in conscious rabbit: influence of the route of administration and of the dose.

J. Pharmacokinet. Biopharm. **20(5)**: 467-476 (1992).

Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.D., Redinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A.

Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture.

Biol. Celll. **47**: 323-330 (1983).

Piquette-Miller M., Park A., Kim H., Anari R., Shahzamani A.

Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation.

Pharm. Res. **15(5)**: 706-711 (1998).

Plá Delfina J.M., Moreno J.

Intestinal absorption-partition relationships: a tentative functional nonlinear model.

J. Pharmacokinet. Biopharm. **9**: 191-215 (1981).

Price A.H., Clissold S.P.

Salbutamol in the 1980s: A Reappraisal of its Clinical Efficacy.

Drugs **38(1)**: 77-122 (1989).

Ranaldi G., Islam K., Sambuy Y.

Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents.

Antimicrob. Agents Chemother. **36(7)**: 1374-1381 (1992).

Ranaldi G., Islam K., Sambuy Y.

D-cycloserine uses an active transport mechanism in the human cell line Caco-2.

Antimicrob. Agents Chemother **38(6)**: 1239-1245 (1994).

Ranaldi G., Seneci P., Guba W., Islam K., Sambuy Y.

Transport of the antibacterial agent oxazolidin-2-one and derivatives across intestinal (Caco-2) and renal (MDCK) epithelial cell lines.

Antimicro. Agents Chemother. **40**: 652-658 (1996).

Rao V.V., Dehlheimer J.L., Bardgett M.E., Snyder A.Z., Finch R.A., Sartorelli A.C., Piwnicka-Worms D.

Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 3900-3905 (1999).

Rey E., Luquel L., Richard M.O., Offenstadt G., Olive G.

Pharmacokinetics of intravenous salbutamol in renal insufficiency and its biological effects.

Eur. J. Clin. Pharmacol. **37(4)**: 387-389 (1989).

Riordan J.R., Ling V.

Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster cell mutants with reduced colchicine permeability.

J. Biol. Chem. **254(24)**: 12701-12705 (1979).

Rodríguez-Boulán E.

Morphogenesis of the polarized epithelial phenotype.

Science **245**: 718-725 (1989).

Ruiz-Balaguer N., Náchter A., Casabó V.G., Merino M.

Nonlinear intestinal absorption kinetics of cefuroxime axetil in rats.

Antimicrob. Agents. Chemother. **41(2)**: 445-448 (1997).

Saitoh H., Aungst B.J.

Possible involvement of multiple P-glycoprotein-mediated efflux systems in the transport of verapamil and other organic cations across rat intestine.

Pharm. Res. **12**: 1304-1310 (1995).

Saitoh H, Hatakeyama M, Eguchi O, Oda M., Takada M.

Involvement of intestinal P-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine.

J. Pharm. Sci. **87(1)**: 73-75 (1997).

Sakai M., Noach A.B., Blom-Roosemalen M.C., de Boer A.G., Breimer D.D.

Absorption enhancement of hydrophilic compounds by verapamil in Caco-2 cell monolayers.

Biochem. Pharmacol. **48(6)**: 1199-1210 (1994).

Sánchez-Castaño G., Ruíz-García A., Bañón N., Bermejo M.V., Merino V., Freixas J., Garrigues T.M., Plá.Delfina J.M.

Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on in situ absorption rate constants and/or in vitro partition coefficients: 6-fluoroquinolones.

J. Pharm. Sci. **89(11)**: 1395-1403 (2000).

Sánchez Picó A., Peris Ribera J.E., Toledano C., Torres Molina F., Casabó V.G., Martín Villodre A., Plá Delfina J.M.

Contribución al estudio de las ventanas de absorción del baclofen en distintos tramos del intestino de rata.

2nd European Congress of Biopharm. And Pharmacokin. Salamanca. Vol II:252-260 (1984).

Sancho-Chust V., Fabra-Campos S., Gómez-Meseguer V., Bengoechea M., Martín-Villodre A.

Experimental studies on the influence of surfactants on intestinal absorption of drugs. Cefadroxil as model drug and sodium lauryl sulfate as model surfactant: studies in rat colon.

Arzneim.Forsch. **45(5)**:595-601 (1995)

Sandstrom R., Karlsson A., Knutson L., Lennernas H.

Jejunal absorption and metabolism of R/S-verapamil in humans.

Pharm. Res. **15(6)**: 856-862 (1998).

Schaub T.P., Kartenbeck J., Koenig J., Vogel O., Witzgall R., Kriz W., Keppler D.

Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules.

J. Am. Soc. Nephrol. **8**: 1213-1221 (1997).

Shah V.P., Midha K.K., Digue S., Mc Gilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C.T., Cook C.E., Mc Dowall R.D., Pittman K.A., Spector S.

Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies.

Pharm. Res. **9**: 588-592 (1992).

Silverman J.A., Raunio H., Gant T.W., Thorgeirsson S.S.

Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family.

Gene **106**: 229-236 (1991).

Sinko P.J., Hu M., Amidon G.L.

Carrier mediated transport of amino acids, small peptides and their drug analogs.

Controlled Release **6**: 115-121 (1987).

Smit J.J.M., Schinkel A.H., Elferink R.P.

Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.

Cell **75**: 451-462 (1993).

Smith D.J.

The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock.

J. Anim. Sci. **76(1)**: 173-194 (1998).

Soldner A., Christians U., Susanto M., Wachter V.J., Silverman J.A., Benet L.Z.

Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport.

Pharm. Res. **16(4)**: 478-485 (1999).

Spahn-Langguth H., Baktir G., Radschuweit A., Okyar A., Terhaag B., Ader P., Hanafy A., Langguth P.

P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potencial in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as a model compound.

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. **36(1)**:16-24 (1998).

Stewart B.H., Chan O.H., Lu R.H., Reyner E.L., Schmid H.L., Hamilton H.W., Steinbaugh B.A., Taylor M.D.

Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans.

Pharm. Res. **12**: 693-699 (1995).

Stone B.G., Larsen L.J., Knoll D.A., Bloomfield V.A., Duane W.C.

Separation of bile vesicles and micelles by gel filtration chromatography: the importance of the intermicellar bile salt concentration.

Lab. Clin. Med. **119**: 557-565 (1992).

Su S. F., Huang J.D.

Inhibition of the intestinal digoxin absorption and exsorption by quinidine.

Drug Metab. Dispos. **24**: 142-147 (1996).

Taburet A.M., Schmit B.

Pharmacokinetic optimisation of Asthma Treatment.

Clin. Pharmacokinet. **26(5)**: 396-418 (1994).

Takanaga H., Ohnishi A., Matsuo H., Sawada Y.

Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells.

Biol. Pharm. Bull. **21(10)**: 1062-1066 (1998).

Tamisier L., Delhotal L.B., Jolliet R.P., Milliez J., Jannet D., Barre J., Flouvat B.
Plasma assay of Salbutamol by means of high-performance liquid chromatography with amperimetric determination using a loop column for injection of plasma extracts. Application to the evaluation of subcutaneous administration of Salbutamol.
Ther. Drug. Monit. **14(3):** 243-248 (1992).

Taniguchi K., Wada M., Kohno K., Nakamura T., Kawabe T., Kawakami M., Kagotani K., Okumura K., Akiyama S., Kuwano M.
A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation.
Cancer Res. **56:** 4124-4129 (1996).

Terao T., Hisanaga E., Sai Y., Tamai Y., Tsuji A.
Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein as an absorption barrier.
J. Pharm. Pharmacol. **48(10):** 1083-1089 (1996).

Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M. M., Pastan Y., Willingham M. C.
Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84:** 7735-7738 (1987).

Ueda K., Taguchi Y., Morishima M.
How does P-glycoprotein recognize its substrates?
Sem. Cancer Biol. **8:**151-159 (1997).

Van Veen H.W., Konigs W.N.

Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function.
Sem. Cancer Bio. **8**:183-191 (1997).

Velasquez L., Muñoz R.

The treatment of hyperkalemia with salbutamol.
Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. **48(11)**: 775-779 (1991)

Wijnholds J., Scheffer G.L., Van der Valk M., Beijene J.H., Scheper R.J., Borst P.

Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage.
J. Exp. Med. **188**: 797-808 (1998).

Wilson G., Hassan I.F., Dix C.J., Williamson I., Shah R., Mackay M.

Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An *in vitro* model of the intestinal epithelial cell barrier.
J. Controlled Release **11**: 25-40 (1990).

Zamora J.M., Pearce H.L., Beck W.T.

Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells.
Mol. Pharmacol. **33**:454-462 (1998).

Zweibaum A.

Differentiation of human colon cancer cells. Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport.
Life Sci. **218**:27-37 (1991).

