

ESTUDIO DE LA LINEALIDAD CINÉTICA DEL PROCESO DE ABSORCIÓN DE NORFLOXACINO Y OFLOXACINO EN MONOCAPAS CELULARES DE CACO-2

Ricardo Nalda, Teresa M^a Garrigues, Marival Bermejo, Virginia Merino.

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
Av. Vicente A. Estellés sn. 46100 Burjassot Valencia*

Introducción

Existe cierta controversia en relación con los mecanismos implicados en la absorción intestinal de las quinolonas. Mientras que algunos autores han caracterizado el proceso de absorción de norfloxacin y ofloxacin en rata como un proceso activo (1, 2). Otros trabajos llevados a cabo en estos mismos animales no han puesto de manifiesto al sistema transportador (3).

Las monocapas de Caco-2, obtenidas a partir de células de carcinoma de colon humano, presentan gran similitud con el epitelio intestinal. Estas células han demostrado ser de gran validez para la realización de estudios in vitro de la absorción intestinal y de determinación de la influencia de procesos de transporte activo en la misma (4).

El objetivo de este trabajo de investigación es estudiar la linealidad cinética del proceso de absorción de norfloxacin y ofloxacin en monocapas de células Caco-2.

Materiales y Métodos

Se utilizaron líneas celulares de Caco-2 de la cepa ATCC. Los ensayos de permeabilidad se llevaron cabo entre los días 19 y 22 de crecimiento, después de la siembra, en membranas porosas de policarbonato de superficie 4.2 cm² y 3 μm de diámetro poro. La integridad de la monocapa celular se comprobó mediante la medida de la resistencia eléctrica de cada inserto (micro-polímetro Millicell-ERS®.4) antes y después del desarrollo del ensayo de permeabilidad.

El ensayo se realizó en un incubador de temperatura controlada a 37°C, y con una agitación continua de 50 r.p.m.

Para caracterizar la permeabilidad de cada fármaco se dispuso una disolución del mismo en la cámara que actuaba como dadora y se determinaron las cantidades acumuladas en el compartimento que actuaba como receptor en función del tiempo. Se ensayaron 6 concentraciones de cada compuesto, entre 20 y 2000 μM de norfloxacin, y 5-2000 μM de ofloxacin. El ámbito de concentraciones estudiadas ha estado determinado por el límite de detección del sistema de análisis y por la solubilidad de los compuestos en los medios empleados.

La técnica empleada para la valoración de las muestras ha sido la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa y posterior detección por fluorescencia. Los métodos analíticos fueron convenientemente validados en el ámbito de concentraciones analizadas.

Para determinar la permeabilidad efectiva (P) en ambos sentidos se lleva a cabo la regresión lineal de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor (ΔQ) frente al tiempo de toma de muestras. La pendiente resultante dividida por la concentración (C) en el compartimento dador y la superficie (S) de la membrana absorbente corresponde a P (cm/s). (Ecuación 1).

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = P \cdot C \cdot S \quad \text{Ecuación 1}$$

Los flujos apical-basolateral (P_{AB}) y basolateral-apical (P_{BA}) utilizados corresponden a la media de al menos tres replicados. Para el estudio de la linealidad cinética del proceso de absorción se han determinado los cocientes P_{BA}/P_{AB} .

Resultados y Discusión

Los valores de los cocientes P_{BA}/P_{AB} para las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los dos compuestos se muestran en las figuras 1 y 2.

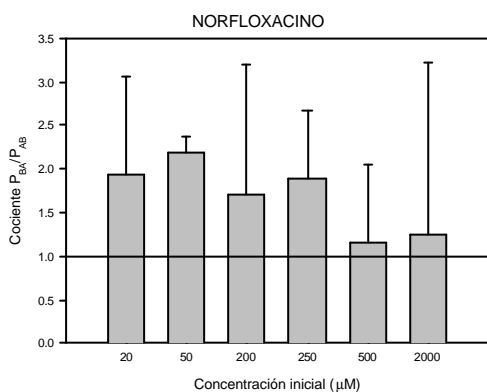


Figura 1. Cociente de permeabilidades BA/AB obtenido para las distintas concentraciones de norfloxacino ensayadas.

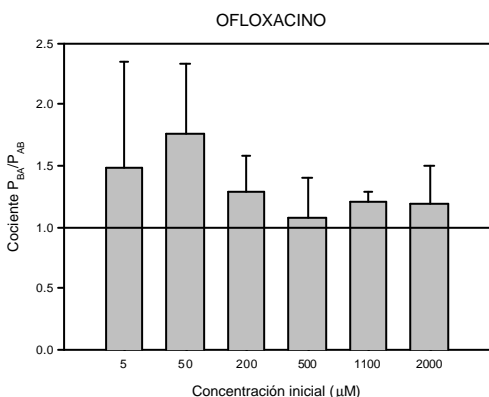


Figura 2. Cociente de permeabilidades BA/AB obtenido para las distintas concentraciones de ofloxacino ensayadas..

En algunos casos la variabilidad observada es importante, su origen no puede atribuirse a problemas de tipo analítico ni a integridad de las líneas celulares (ambos aspectos han sido estrictamente analizados).

Los valores de los cocientes de permeabilidades obtenidos en todos los casos incluyen al uno dentro de su intervalo de confianza, por lo que puede asumirse que las permeabilidades caracterizadas en los dos sentidos son coincidentes (excepto norfloxacino a la concentración 50 μM y ofloxacino 1100 μM).

Si se considera que las células Caco-2 sobreexpresan algunos sistemas de transporte, cabe esperar que, en caso de existir un sistema activo implicado en la absorción de determinadas sustancias resulte más fácil ponerlo de manifiesto en las mismas que en estudios in situ o in vivo.

Así pues se puede considerar que en caso de existir algún tipo de transportador implicado en la absorción oral de estas quinolonas será de muy baja afinidad y se saturará a concentraciones inferiores a las empleadas en este trabajo.

Bibliografía

1. Griffiths N. M. Y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 269, 496, (1994).
2. Rabbaa L y col., Antimicrob Agents Chemother, 41(10), 227,4(1997).
3. Escribano E y col., Eur J Drug Metab Pharmacokin, 3, 57, (1991).
4. Per Artursson y col., J. Pharm. Sci., 79 (7), 595, (1990).