

EXISTENCIA DE UN MECANISMO ESPECIALIZADO DE TRANSPORTE PARA EL RITONAVIR EN EL INTESTINO DELGADO DE LA RATA.

Amparo Nácher, Rocío Lledó, Fco. Javier Mañez, M^a José Muñoz, Vicente G. Casabó y Matilde Merino.

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, Avda. Vicente A. Estellés s/n 46100. Burjassot (Valencia).

Introducción

El ritonavir es un fármaco antirretroviral que actúa inhibiendo la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), impidiendo, de ese modo, la replicación del mismo.

Uno de los problemas que plantea la administración oral del ritonavir es la variabilidad en la respuesta terapéutica, tanto inter como intraindividual, de modo que la misma dosis administrada a distintos individuos puede provocar, en algunos casos, toxicidad y/o efectos secundarios y en otros, niveles subterapéuticos (1,2), esto conlleva una ineficacia del tratamiento, que podría paliarse o subsanarse si se conociera con profundidad el comportamiento farmacocinético del fármaco.

La presencia de alimento en el tracto gastrointestinal modifica la biodisponibilidad en magnitud del fármaco. Para algunos antirretrovirales se ha observado que los alimentos aumenta la biodisponibilidad, mientras que para otros la disminuye (3,4,5). El efecto del alimento en la absorción gastrointestinal del ritonavir varía dependiendo de la forma de dosificación utilizada (6).

El objetivo de este trabajo es profundizar en el mecanismo de absorción gastrointestinal del ritonavir, con el fin de caracterizar, en caso de que existan, procesos de transporte activo, bien de absorción o de secreción del fármaco en el intestino delgado, ya que dependiendo de la magnitud de cada uno de estos procesos es posible cuantificar la incorporación del fármaco al torrente circulatorio siendo éste el primer paso

para proponer la utilización de recursos o alternativas tecnológicas, que permitan modular y mejorar el rendimiento del proceso de absorción del fármaco.

Materiales y Métodos

Los ensayos de absorción se han realizado utilizando la técnica de perfusión *in situ* (7).

Se perfundieron 10ml de solución isotónica de ritonavir, preparada a partir de la sustancia en polvo, a la concentración de 40 μ M, 27 μ M, 13 μ M, 7 μ M, adicionadas de un 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), con el fin de mejorar la solubilidad. Por otra parte, se utilizó antipirina 1.33 mM en ausencia y en presencia de un 1% de DMSO, con el objetivo de determinar la influencia del DMSO sobre la permeabilidad de la membrana absorbente y sobre el flujo sanguíneo.

La valoración del ritonavir en las muestras intestinales se realizó mediante cromatografía líquida, utilizando un detector UV ($\lambda=235$ nm) y una columna cromatográfica de fase inversa (Symmetry C-18, 150 \times 4.6 mm). La valoración de la antipirina también se realizó por HPLC, ($\lambda=254$ nm) usando el mismo aparataje que para el ritonavir y columna (Novapack C-18, 150 \times 3.9 mm). La fase móvil empleada para la cuantificación del ritonavir consistió en una mezcla de acetonitrilo y de una solución formada por un 99% de agua bidestilada y un 1% de tampón fosfato 1/15 M (pH 6.9). La proporción utilizada en la valoración fue de 60:40 (V/V). En la valoración de la antipirina se empleó una

mezcla de acetonitrilo y solución acuosa de ácido ortofosfórico 0.01 M (pH 4.5), en proporción volumétrica 15:85 (V/V).

Con objeto de establecer la existencia o no de linealidad cinética en el proceso de absorción se utilizó, como parámetro representativo de la velocidad de absorción del fármaco la constante de velocidad de absorción de primer orden, obtenida mediante regresión no lineal a partir de las concentraciones de ritonavir remanentes en el lugar de absorción a los distintos tiempos de muestreo. Posteriormente las constantes de velocidad de absorción, obtenidas para cada concentración inicial de perfusión, se compararon estadísticamente mediante la realización de un ANOVA de una vía.

Para realizar el ajustado cinético se han empleado modelos matemáticos en los que se considera que el proceso de incorporación del fármaco al organismo se realiza mediante un mecanismo especializado de transporte (modelo 1) y en el que la incorporación de fármaco al organismo es el resultado de dos procesos contrapuestos, uno de entrada desde el lumen al enterocito (absorción) y otro de salida de fármaco desde el enterocito al lumen (secreción) (modelo 2), ambos considerados procesos especializados de transporte. Para el ajuste, se empleó el programa informático WINNOLIN (ponderación $1/A_{\text{teor}}^2$).

Modelo 1:

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{Vm \cdot A}{Km + A}$$

Modelo 2:

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{Vm \cdot A}{Km + A} + \frac{Vm_s \cdot A}{Km_s + A}$$

Resultados y Discusión

La constante de velocidad de absorción de la antipirina en disolución libre es $4.81 \pm 1.14 \text{ h}^{-1}$, y en presencia de un 1% de DMSO $4.73 \pm 0.49 \text{ h}^{-1}$. El ANOVA de una vía no detecta diferencias significativas entre el valor de las constantes ($p=0.856$), lo que indica que el DMSO al 1% no

modifica la permeabilidad de la antipirina por difusión pasiva a través de la membrana.

Las concentraciones de ritonavir remanentes en el lugar de absorción, así como las curvas teóricas proporcionadas por el ajustado diferencial según un modelo de absorción y secreción con cinética de Michaelis-Menten, se representan en la figura 1.

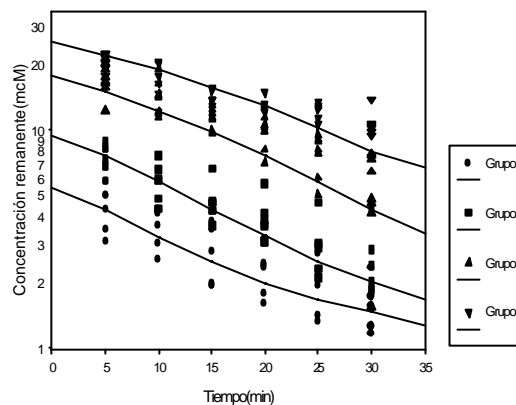


Figura 1. Representación gráfica de las concentraciones remanentes en luz intestinal, obtenidas tras la perfusión de disoluciones de Ritonavir a distintas concentraciones (7 μM [Grupo 1], 13 μM [Grupo 2], 27 μM [Grupo 3] 40 μM [Grupo 4]) a los tiempos de toma de muestra.

Los resultados obtenidos en el ajuste de las ecuaciones correspondientes a los modelos seleccionados, se muestran en el cuadro 1, y sugieren que la incorporación al organismo del ritonavir obedece a un mecanismo de absorción y secreción, simultáneos, de Michaelis-Menten.

Estos resultados indican que la absorción del ritonavir está mediada, al menos, por un portador saturable, siendo la difusión pasiva despreciable. Asimismo, se puede observar que el valor de la constante del proceso de secreción de Michaelis-Menten (Km_s) es inferior al valor de la constante del proceso de absorción de Michaelis-Menten (Km), ello implica una mayor afinidad por el transportador de secreción que por el de absorción, por lo que el proceso de secreción se satura antes que el de absorción. La capacidad del transportador de secreción es menor que el

de absorción, como se interpreta de los valores de velocidad máxima de absorción (V_m) y velocidad máxima de secreción (V_{m_s}).

Tabla1. Parámetros cinéticos y estadísticos que definen la cinética de absorción y secreción intestinal del ritonavir, determinadas tras el ajustado de las ecuaciones diferenciales correspondientes.

PARAMETROS	MODELO CINÉTICO	
	absorción de Michaelis-Menten (Modelo 1)	absorción y secreción de Michaelis-Menten (Modelo 2)
$V_m(mM/h)$	120.612±74.844	67.368±211.71
$K_m(mM)$	35.617±25.658	9.018±168.718
$V_{m_s}(mM/h)$		7.554±963.18
$K_{m_s}(mM)$		0.002±0.042
FA_0	0.860±0.059	0.815±95.405
FA_0	0.678±0.039	0.704±1.369
FA_0	0.647±0.049	0.668±21.979
FA_0	0.655±0.059	0.663±3.386
S.C.	11.476	10.717
AIC	402.44	395.49

No obstante, los parámetros cinéticos estimados, se deben valorar con cierta reserva; ya que pueden estar afectados por el restringido ámbito de concentraciones ensayadas. Este ámbito ha quedado limitado, en su concentración máxima, por la baja solubilidad del fármaco y, en su concentración mínima, por el límite de cuantificación del método analítico.

Bibliografía

1. Kilby J.M., Sfakianos G., Gizzi N., Siemoon-Hryczyk P., Ehrensing E., O C., Buss N., Saag M.S. Safety and pharmacokinetics of once-daily regimens of soft-gel capsule saquinavir plus minidose ritonavir in human immunodeficiency virus negative adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 (10), 2672-8 (2000) Artículos: Autores, revista, volumen, primera página, (año).
2. Cohen C.J., Hellinger J. Norris D. Evaluation of simplified protease inhibitor dosing regimens for de treatment of HIV infections. *AIDS Read.* 10(5), 296-9, 304-7, 311-3 (2000).
3. Jiménez-Torres N. Victor, Merino-Sanjuán M., Ordovás Banés J., Casabó-Alós V.G. Interacciones entre medicamentos y alimentos: bases farmacoterapéuticas. Edita Convaser, CEE. Valencia (1999).
4. BDCG. BOT. Consejo General del Colegio Oficial de Farmacéuticos. CD-Junio (1999).
5. MICROMEDEX. Health Care Series. <http://www.sefh.es/mdxdocs/>.
6. Flexner C, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of HIV protease inhibitors. (1996).
7. 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 (1969)

Autor de contacto:

Amparo Nacher.
 amparo.nacher@uv.es
 Universidad de Valencia.
 Avda. Vicente A. Estellés s/n 46100. Burjassot.
 Valencia.
 Telf.: 963544916 Fax: 963544911.