

## PREDICCIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL: CORRELACIÓN IN VITRO-IN SITU PARA FÁRMACOS CON MECANISMOS ACTIVOS DE SECRECIÓN

Margarita Rodríguez- Ibáñez, Teresa M<sup>a</sup> Garrigues, Virginia Merino, Marival Bermejo

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.  
Av. Vicente A. Estellés sn. 46 100 Burjassot Valencia

### Introducción

Las monocapas de Caco-2 son células de carcinoma de colon humano que presentan una gran similitud con el epitelio intestinal. Los estudios de permeabilidad en ellas se han validado recientemente como técnica de estudio in vitro de la absorción intestinal y de determinación de la influencia de procesos de transporte activo en la misma (1). En trabajos recientes se ha demostrado que la secreción intestinal mediada por transportadores, tales como la glicoproteína-P, puede repercutir en la biodisponibilidad oral de algunos fármacos, ya que el citado proceso disminuye la absorción del mismo a través de la membrana intestinal. Este fenómeno ha sido descrito para algunas fluoroquinolonas (2,3)

No obstante la relevancia de los procesos de secreción observados in vitro no siempre se reproduce en sistemas biológicos más complejos. Así pues en el presente trabajo se ha intentado obtener una correlación entre los valores de permeabilidad obtenidos en monocapas Caco-2 con los determinados in situ en rata para una serie de fármacos en los que previamente se había caracterizado tanto in vitro como in situ la presencia de un proceso de secreción activa intestinal.

### Materiales y Métodos

Para los ensayos in vitro se utilizaron líneas celulares de CaCo-2 de la cepa ATCC

sembradas y cultivadas entre 19 y 22 días en membranas porosas de policarbonato de 3 µm de diámetro de poro y una superficie de 4.2 cm<sup>2</sup>. La integridad de la monocapa celular se comprobó mediante la medida de la resistencia eléctrica de cada inserto. Para ello se utilizó un micro-polímetro Millicell-ERS®.4

El ensayo de permeabilidad 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.

Para determinar la permeabilidad efectiva ( $P_{ef}$ ) en ambos sentidos se lleva a cabo la regresión lineal de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor ( $\Delta Q$ ) 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  $P_{ef}$  (cm/s). (Ecuación 1).

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = P_{ef} \cdot C \cdot S$$

Ecuación 1

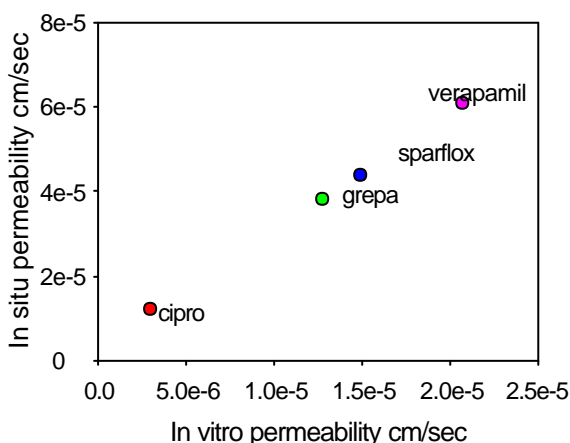
Los flujos apical-basolateral (PAB) y basolateral-apical (PBA) utilizados corresponden a la media de tres replicados. Para la correlación se

utilizaron las permeabilidades apical-basolateral (PAB).

La determinación de la permeabilidad intestinal se realizó por un método de perfusión "in situ" en intestino completo de rata Wistar sin recirculación (4). Se utilizaron animales de peso comprendido entre 220-240 gramos, tras 24 horas de ayuno. Se perfundieron soluciones de cada fármaco a las mismas concentraciones de los ensayos *in vitro*. Las permeabilidades aparentes se obtuvieron por ajustado de la ecuación monoexponencial a las concentraciones remanentes en lumen a cada tiempo. El exponente obtenido corresponde a la constante aparente de primer orden que se transforma en permeabilidad intestinal multiplicando por la relación volumen/área intestinal. La valoración de las muestras obtenidas en ambos sistemas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución. Todos los métodos analíticos fueron convenientemente validados en el ámbito de concentraciones experimentales.

### Resultados y Discusión

La correlación obtenida entre las permeabilidades *in situ* e *in vitro* se presenta en la figura 1.



**Figura 1.** Correlación obtenida entre permeabilidades AB obtenidas *in vitro* y permeabilidades *in situ* en rata.

Cabe destacar la excelente correlación obtenida. Ello se debe a que, aunque los cuatro fármacos ensayados presentan tanto *in vitro* como *in situ* procesos de secreción activa mediados por

Glicoproteína p o algún transportador MRP, a las concentraciones ensayadas dichos procesos se encontraban completamente saturados en ambos sistemas y por lo tanto su relevancia en la permeabilidad efectiva total era muy pequeña. En ese caso predomina la difusión pasiva a través de membrana lipídica y como era previsible este proceso es bien descrito por el sistema *in vitro*. No obstante, debe considerarse, que los niveles de expresión de los distintos portadores de secreción son diferentes en el modelo *in situ* frente al animal, por lo que también pueden serlo los valores de  $V_m$ ; así pues, si las concentraciones ensayadas son distintas, podría no ser posible establecer esta correlación. Serán necesarios estudios que incluyan moléculas de estructura diversa a distintas concentraciones para establecer la verdadera relación o factor de escala entre los procesos activos *in vitro* versus *in situ*.

### Bibliografía

1. Per Artursson, et al, *J. Pharm. Sci.*, 79 (7), 595, (1990).
2. Griffiths N. M., et al, *Br. J. Pharmacol.*, 108, 575, (1993).
3. Griffiths N. M., et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269, 496, (1994).
4. Bermejo M, et al. *J Pharm Sci*88:398-405 (1999)

### Autor de contacto:

Marival Bermejo  
 mbermejo@uv.es  
 Universidad de Valencia  
 Av. Vicente A. Estelles sn. Depto Gaénica Fac.  
 Farmcia  
 Burjassot 46100 Valencia  
 Telf.: 96 3544916  
 Fax: 963544911