

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Química-Farmacia
Centro de Bioactivos Químicos



Caracterización farmacocinética de la absorción intestinal del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano: Aplicación de métodos "In Silico" para la predicción de esta propiedad en derivados de 6-fluoroquinolonas y a una familia de 2-nitrovinilfuranos.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas.

Autor: Prof. Asis., M.Sc. Miguel Ángel Cabrera Pérez

Tutor: Prof. Tit, Dr.C. Eduardo Fernández Sánchez

Prof. Aux. Dr.C. Nilo Castañedo Cancio

Santa Clara

2003

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Química-Farmacia

Centro de Bioactivos Químicos



Caracterización farmacocinética de la absorción intestinal del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano: Aplicación de métodos "In Silico" para la predicción de esta propiedad en derivados de 6-fluoroquinolonas y a una familia de 2-nitrovinilfuranos.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas.

Autor: Prof. Asis., M.Sc. Miguel Angel Cabrera Pérez

Tutor: Prof. Tit, Dr.C. Eduardo Fernández Sánchez

Prof. Aux. Dr.C. Nilo Castañedo Cancio

Santa Clara

2003



"When you have a deep truth, then the opposite of a deep truth may again be a deep truth."

Niels Bohr

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todos estos años han sido muchas las personas que me han acompañado y a todas ellas deseo agradecerle en estos momentos su ayuda solidaria, sería injusto mencionar un nombre por el temor de olvidar alguno.

A TODOS, INFINITAS GRACIAS



DEDICATORIA



A mi pequeño Miguel Alejandro

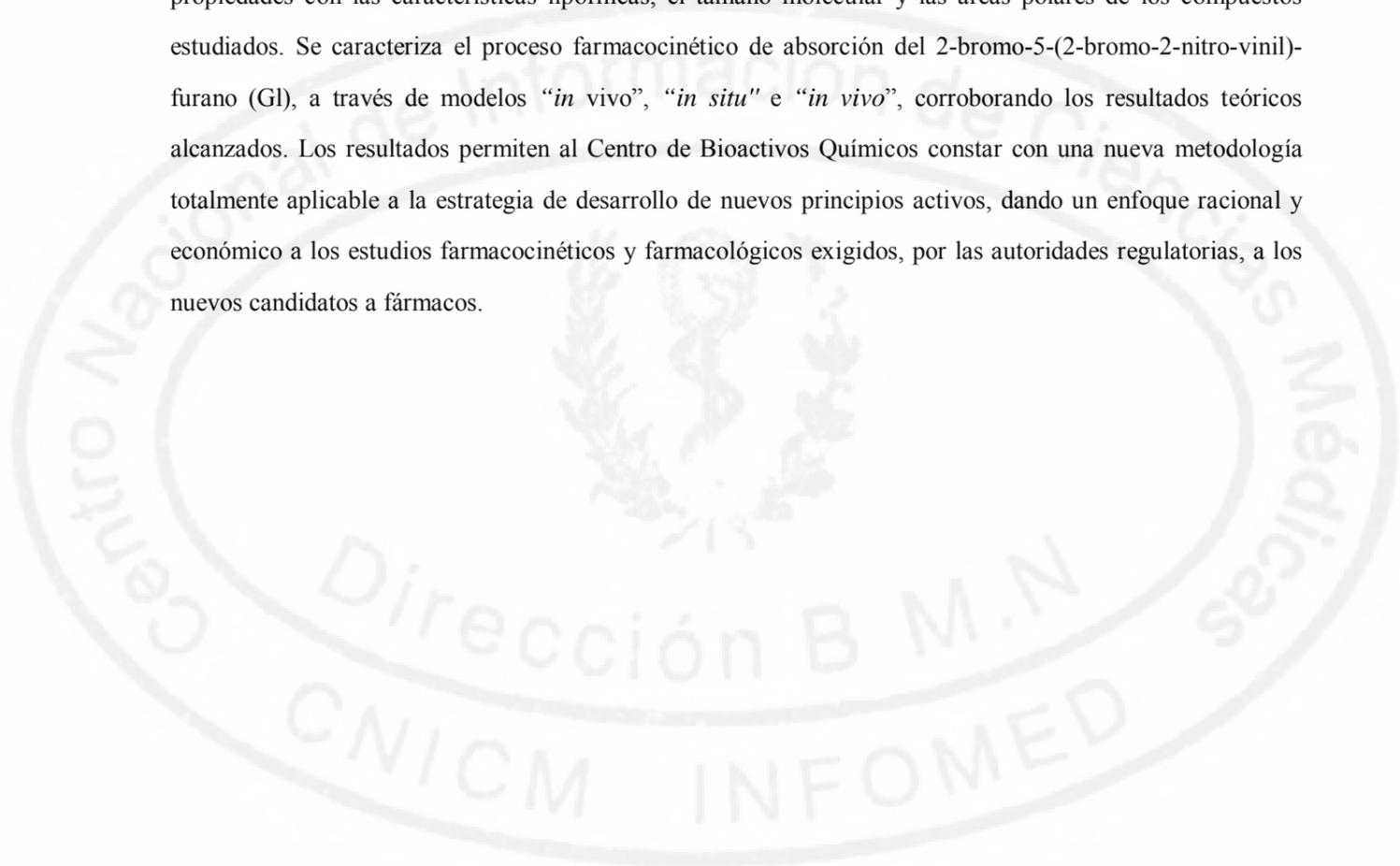
A mi esposa Mirleida Santos

A mi Madre y Hermana

A los que ya no están, pero su recuerdo y ejemplo siempre me acompañaron

SÍNTESIS

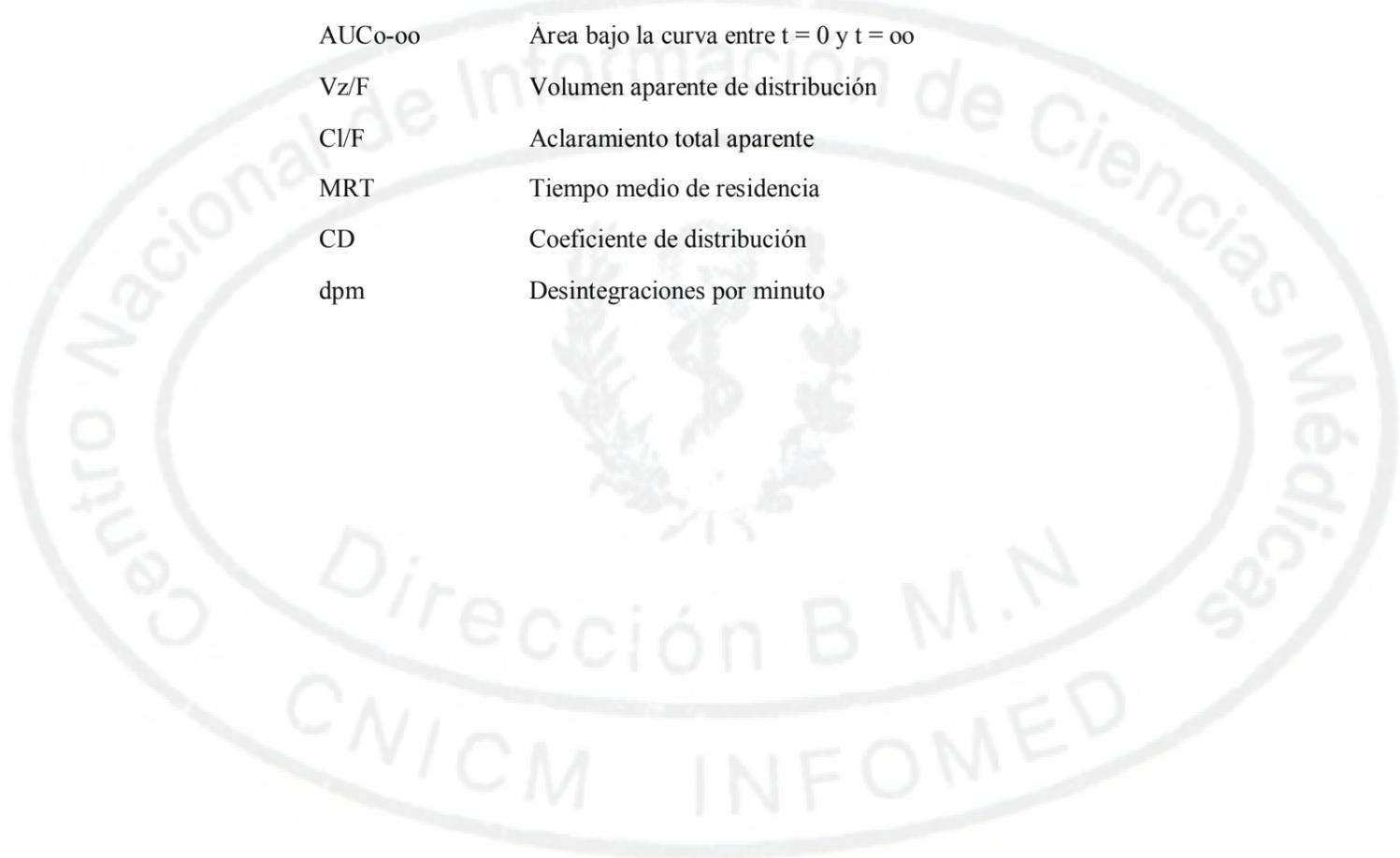
En el presente trabajo se implementa una aproximación subestructural "*in silico*" (TOPS-MODE) para la predicción de propiedades físico-químicas, de absorción y farmacocinéticas a una familia de 6-fluoroquinolonas y a nuevos derivados 2-nitrovinilfuránicos. Los modelos teóricos obtenidos, corroborados experimentalmente en algunos miembros de ambas familias, evidencian la estrecha relación de estas propiedades con las características lipofílicas, el tamaño molecular y las áreas polares de los compuestos estudiados. Se caracteriza el proceso farmacocinético de absorción del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano (G1), a través de modelos "*in vivo*", "*in situ*" e "*in vivo*", corroborando los resultados teóricos alcanzados. Los resultados permiten al Centro de Bioactivos Químicos constar con una nueva metodología totalmente aplicable a la estrategia de desarrollo de nuevos principios activos, dando un enfoque racional y económico a los estudios farmacocinéticos y farmacológicos exigidos, por las autoridades regulatorias, a los nuevos candidatos a fármacos.



GLOSARIO

NEM	Nueva Entidad Molecular
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
TOPS MODE	TOPological Substructural Molecular DEsign
F	Biodisponibilidad
MCI90	Mínima Concentración Inhibitoria 90
AIH	Absorción Intestinal en Humanos
Log P _{oc/a}	Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua
Log Ka	Logaritmo de la constante de velocidad de absorción aparente
Log Peff	Logaritmo del coeficiente de permeabilidad intestinal "m <i>situ</i> "
Log F	Logaritmo de la biodisponibilidad
Log (1/MIC ₉₀)	Logaritmo del inverso de la Mínima Concentración Inhibitoria 90
Log P _{oct-7.4}	Coficiente de partición octanol-buffer salino pH=7.4
R	Coficiente de correlación
R ²	Coficiente de determinación
S	Desviación estándar
λ	Lambda de Wilks
D ²	Distancia de Mahalanobis al cuadrado
F _{exp}	Razón de Fisher experimental
S _{cv}	Desviación estándar de la validación cruzada
G1	2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano
GO	2-(2-nitro-vinil)-furano
UC-244	2-(2-metil-2-nitro-vinil)-furano
UC-245	2-bromo-5-(2-metil-2-nitro-vinil)-furano
MBr-A	2-bromo-5-(2-nitro-vinil)-furano
MBr-C	2-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano
PEG-6000	Polietilenglicol 6000
T _a	Tiempo de agitación
T _e	Tiempo de centrifugación
pKa	Constante de disociación

HBI	Capacidad de formación de puentes de hidrógeno
Papp	Permeabilidad intestinal aparente "in vitro"
tmáx	Tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima
Cmáx	Concentración máxima
λz	Constante de velocidad de eliminación
t _{1/2}	Tiempo de vida media de eliminación
AUC ₀₋₄₈	Área bajo la curva entre t = 0 y t = 48 horas
AUC _{0-∞}	Área bajo la curva entre t = 0 y t = ∞
Vz/F	Volumen aparente de distribución
Cl/F	Aclaramiento total aparente
MRT	Tiempo medio de residencia
CD	Coficiente de distribución
dpm	Desintegraciones por minuto



INDICE

	Pag
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Estudios Farmacocinéticos. Aspectos Generales	5
1.1.1 Introducción	5
1.1.2 Procesos ADME. Valoración general	5
1.1.2.1 Absorción	5
1.1.2.2 Distribución	6
1.1.2.3 Eliminación	6
1.1.3 Análisis compartimental	7
1.1.3.1 Modelos farmacocinéticos	7
1.1.3.2 Análisis no-compartimental	8
1.1.4 Estudios de biodistribución	9
1.1.4.1 Técnicas radioisotópicas en estudios de biodistribución	9
1.2 Absorción de fármacos	10
1.2.1 Factores que influyen en la absorción de los fármacos por vía oral	10
1.2.1.1 Factores físico-químicos de la formulación que influyen en la absorción	10
1.2.1.2 Factores físico-químicos del fármaco que influyen en la absorción	10
1.2.1.3 Factores fisiológicos y patológicos que influyen en la absorción de fármacos	11
1.3 Morfología del intestino	11
1.4 Mecanismos de transporte de membrana	12
1.4.1 Transporte pasivo transcelular	12
1.4.2 Transporte paracelular	12
1.4.3 Transporte mediado por transportador y por eflujo	13
1.5 Modelos “in vitro” para la predicción del transporte a través de la membrana intestinal	14
1.5.1 Partición en sistemas isotrópicos	14
1.5.2 Transporte a través de sacos intestinales evertidos	15
1.6 Modelos “in situ” para estudios de transporte a través de la membrana intestinal	16
1.7 Modelos “in vivo” para la determinación de la permeabilidad intestinal	17
1.8 Modelos “in silico” para la predicción de la permeabilidad intestinal	17
1.8.1 Propiedades moleculares que influyen en el transporte pasivo de fármacos	18
1.8.2 Generación de descriptores calculados	19
1.8.2.1 Descriptores basados en una representación bidimensional	19
1.8.2.2 Descriptores basados en una representación tridimensional	19
1.8.2.3 Descriptores basados en funciones de onda	20
1.8.3 Desarrollo de modelos computacionales	20
1.8.3.1 Modelos cualitativos de la permeabilidad intestinal de membrana	20
1.8.3.2 Modelos cuantitativos de la permeabilidad intestinal de membrana	21
1.8.4 La aproximación TOPS-MODE	23
1.8.4.1 Momentos espectrales ($\int_j J$)	24
1.8.4.2 Momentos espectrales ponderados	24
1.8.4.3 Descriptores definidos localmente. Momentos espectrales locales	25
1.8.4.4 Aplicación general de la aproximación TOPS-MODE	26
1.9 Quinolonas. Propiedades farmacocinéticas y estudios QSAR y QSPR	27
1.10 Nitrovinilfuranos	28
1.10.1 Propiedades generales del GI	29
1.10.1.1 Propiedades físico-químicas del GI	29
1.10.1.2 Estabilidad del GI	29
1.10.1.3 Actividad biológica y toxicidad del GI	30
1.11 Conclusiones Parciales	31

	<i>Pag</i>
CAPÍTULO II. ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, DE ABSORCIÓN, FARMACOCINÉTICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LAS 6- FLUOROQUINOLONAS	32
2.1 Materiales y Métodos	32
2.1.1 Aproximación TOPS-MODE	32
2.1.2 Métodos estadísticos	33
2.1.2.1 Regresión Lineal Múltiple	33
2.1.2.2 Análisis de Factores	33
2.1.2.3 Análisis Discriminante Lineal	34
2.1.2.4 Estimación no lineal: Regresión lineal Piecewise	34
2.1.2.5 Procedimiento de selección de outliers	35
2.1.3 Relación entre la Farmacocinética y la actividad Farmacológica	35
2.1.4 Datos experimentales utilizados en los estudios teóricos	36
2.1.5 Estudios experimentales de absorción	37
2.1.5.1 Compuestos de ensayos	37
2.1.5.2 Técnica biológica de determinación de la absorción intestinal "in situ "	37
2.1.5.3 Estudios de absorción: Biodisponibilidad "in vivo"	41
2.1.5.4 Análisis de las muestras	43
2.1.5.5 Análisis de datos	44
2.2 Resultados y Discusión	44
2.2.1 Predicción de las propiedades físico-químicas y de absorción de 6-fluoroquinolonas	44
2.2.2 Predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de 6-fluoroquinolonas	51
2.3 Conclusiones Parciales	57
CAPÍTULO III. ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y DE ABSORCIÓN DE 2-NITROVINILFURANOS	58
3.1 Materiales y Métodos	58
3.1.1 Aproximación TOPS-MODE	58
3.1.2 Datos experimentales utilizados en los estudios de predicción de propiedades físico-químicas y de absorción de 2-nitrovinilfuranos	61
3.1.3 Modelos "in vitro" e "in situ" para la predicción de la absorción intestinal	61
3.1.3.1 Modelos "in vitro"	61
3.1.3.2 Modelos "in situ "	65
3.1.3.3 Estudios farmacocinéticos y de biodistribución del ¹⁴ C-GI	66
3.2 Resultados y Discusión	71
3.2.1 Predicción teórica y corroboración experimental de propiedades físico-químicas de 2-nitrovinilfuranos	71
3.2.2 Predicción teórica de propiedades de absorción de 2-nitrovinilfuranos	76
3.2.3 Corroboración experimental de las propiedades de absorción del GI	85
3.2.3.1 Estudio "in vitro-de la absorción intestinal del GI	85
3.2.3.2 Estudio "in situ-de la absorción intestinal del GI	89
3.2.4 Estudios farmacocinéticos y de biodistribución del ¹⁴ C-GI	90
3.2.4.1 Análisis farmacocinético del ¹⁴ C-GI	90
3.2.4.2 Análisis de biodistribución del ¹⁴ C-GI	92
3.2.4.3 Excreción de la radioactividad en orina y heces fecales	94
3.3 Conclusiones Parciales	95
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL	97
CONCLUSIONES GENERALES	99
RECOMEN DA CIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	



INTRODUCCION
INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

Los nuevos avances en el descubrimiento de fármacos (química combinatoria y robótica) han provocado que la Industria Médico-Farmacéutica presente serios problemas debido al marcado incremento en el número de nuevas entidades moleculares (NEM) que limitan experimentalmente el ciclo de desarrollo de los fármacos (Patel y Gordon, 1996). Con el advenimiento de la genómica y la proteómica, el número de sitios de acción de los fármacos y de las NEM se espera que incrementen en los próximos años (PhARMA Industry Profile, 2000).

Históricamente, de 250 compuestos que entran a la fase preclínica de desarrollo como nuevos fármacos para la investigación, solamente 5 son evaluados en la clínica y finalmente sólo 1 es aprobado por la *Food and Drug Administrator!* (FDA) para su uso en humanos (Caldwell, 2000; PhARMA Industry Profile, 2000). En esta gran desproporción los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME) y la toxicidad, juegan un papel significativo en el 70 % de las fallas (Egan y col., 2000; Kennedy, 1997; Dimasi, 2001).

El vertiginoso desarrollo en los procesos de obtención de fármacos y de generación de nuevas cabezas de series, ha conllevado a que los nuevos fármacos sean más lipofílicos, menos solubles en agua y de mayor peso molecular que las tradicionales NEM (Stenberg y col., 2000; Egan y Lauri, 2002), por lo que se espera que la velocidad de éxito sea aún más baja, ya que estas características con frecuencia conllevan a propiedades biofarmacéuticas desfavorables. Por lo tanto, los esfuerzos recientes se han dirigido a la reducción del número de candidatos que posteriormente fallan en el proceso, intentando identificar tempranamente a los potencialmente problemáticos (Sinko, 1999).

Dentro de las últimas tendencias de las grandes compañías farmacéuticas se destacan la obtención y utilización de modelos teóricos capaces de predecir las propiedades ADME basadas enteramente en la información químico-estructural, propiciando un tamizaje masivo de fármacos sin la necesidad de sintetizar las moléculas físicamente (van de Waterbeemd, 2002). No obstante a la gran utilidad que representan los nuevos métodos "*in sil ico*" en la predicción de propiedades ADME que son usualmente obtenidas "*m v/vo*", una aplicación combinada de estos con los métodos tradicionales "*m vitro*" devendría en una poderosa herramienta para utilizar, de forma masiva, en un tamizaje preliminar en el desarrollo farmacéutico, incrementando la eficiencia del proceso de descubrimiento de fármacos (Bohets y col., 2001).

Introducción

Con frecuencia se desea que un nuevo fármaco sea administrado oralmente debido a la conveniencia del uso de esta vía para los pacientes, sin embargo, no todos los compuestos poseen propiedades compatibles con la administración oral; de hecho el desarrollo clínico de nuevos fármacos es interrumpido con frecuencia a causa de la pobre biodisponibilidad oral del fármaco, guiando a costos significativos para las compañías farmacéuticas (Arlington, 2000).

Para que un fármaco sea efectivo después de la administración oral, una parte significativa de la dosis administrada debe alcanzar de forma inalterada la circulación sistémica, por lo que la solubilidad y absorción del compuesto son dos de las propiedades de mayor influencia en la extensión de la absorción desde el tracto gastrointestinal. Es por ello que es de vital importancia, en una primera etapa, identificar compuestos cuyas estructuras químicas aseguren una suficientemente alta permeabilidad o al menos ser capaces de delimitar eficientemente aquellos compuestos cuyas permeabilidades son demasiado bajas (Yoshida y Topliss, 2000; Yu y col., 2000)

El Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas ha dirigido sus investigaciones a la producción de fármacos, obtenidos por vía sintética. En este Centro se han sintetizado, hasta la fecha, más de 700 nuevas sustancias, algunas de las cuales presentan una marcada actividad biológica y muchas de ellas no han sido ensayadas como posibles fármacos. Una de ellas, el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano, denominado G1, ha demostrado una potente actividad antibacteriana y antifúngica y cuenta con un amplio estudio químico, toxicológico y farmacéutico (Blondeau y col., 1999; Cortés, 1997; Cortés y col., 1997; Dalton, 1999; Estrada, 1998).

Tomando en consideración la relevancia de los resultados sintéticos alcanzados en el CBQ, así como la demostrada validez de los métodos grafo-teóricos desarrollados por el grupo de Diseño de Fármacos (Estrada, 1996; 1997a; 1998a; 2000a; Estrada y Molina, 2000a; 2001a; Estrada y Gutiérrez, 1999a; Estrada y col., 1998; 2000a; 2000b; 2001a; 2001b; 2001c; Estrada y Peña, 2000a; Estrada y Uriarte, 2001a), consideramos factible la utilización combinada de métodos farmacocinéticos “*w silico*” y experimentales, para la temprana predicción de la adecuada absorción de nuevos candidatos 2-nitrovinilfuranos a ser evaluados como medicamentos.

Por todo lo anterior se plantea el siguiente problema científico:

Introducción

La caracterización farmacocinética del proceso de absorción es una de las etapas principales en el desarrollo de medicamentos para la administración oral, sin embargo la mayoría de los nuevos candidatos a fármacos no logran sobrepasar la fase clínica debido a inapropiadas propiedades de absorción, siendo además la caracterización experimental de este proceso costosa y prácticamente imposible de implementar en el estudio masivo de nuevos candidatos a fármacos.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente hipótesis:

Si es posible a través de métodos topológicos “*in silico*” obtener funciones que relacionen adecuadamente la estructura química, de una familia de antibióticos conocidos como las 6-fluoroquinolonas, con sus propiedades físico-químicas, farmacocinéticas de absorción y farmacológicas, podría utilizarse este mismo enfoque científico en la predicción de estas propiedades para nuevos compuestos pertenecientes a la familia de los 2-nitrovinilfuranos.

Para cumplimentar la anterior hipótesis y dar respuesta a la problemática científica planteada, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

Desarrollar una nueva metodología en el estudio de la absorción de fármacos, a través de la combinación de estudios teóricos “*in silico*” y la posterior corroboración experimental “*in vitro*”, “*in situ*” e “*in vivo*”.

Objetivos específicos

- 1- Implementar una aproximación sub-estructural del diseño molecular (TOPS-MODE, *TOPological Subestructural Molecular DEsign*) para obtener modelos teóricos capaces de predecir propiedades físico-químicas, de absorción y farmacocinéticas-farmacológicas de 6-fluoroquinolonas, con la posterior corroboración experimental en algunos miembros de la familia.
- 2- Instrumentar la aproximación TOPS-MODE para obtener modelos predictivos de propiedades físico-químicas para compuestos pertenecientes a una nueva familia de fármacos (2-nitrovinilfuranos), y la posterior corroboración experimental en algunos de sus miembros.

Introducción

- 3- Implementar la aproximación TOPS-MODE para obtener modelos predictivos generales de propiedades farmacocinéticas de absorción para cualquier familia de fármacos, y específicamente los 2-nitrovinilfuranos.
- 4- Caracterizar el proceso farmacocinético de absorción y de transporte intestinal de un representante de la familia de los 2-nitrovinilfuranos (G1), a través de ensayos “*in vitro*” e “*in situ*”.
- 5- Caracterizar el comportamiento farmacocinético del ^{14}C -G1, en Miglyol 810 N, así como su biodistribución después de una administración de dosis única por vía oral en ratas Sprague Dawley.
- 6- Comparar los resultados alcanzados en las predicciones “*in silico*” de absorción del G1 con los valores experimentales de absorción obtenidos en experimentos “*in vitro*”, “*in situ*” e “*in vivo*”.

La **novedad científica** de este trabajo se fundamenta en la aplicación por vez primera y acorde con las últimas tendencias mundiales, de un método topológico “*in silico*” (TOPS-MODE) para la predicción de propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de absorción sobre una nueva familia de fármacos (2-nitrovinilfuranos) donde uno de sus miembros, el G1, ha demostrado ser un bactericida-fungicida de amplio espectro, único de su tipo a nivel mundial. La utilización de esta metodología conlleva a un resultado final totalmente aplicable a la estrategia de trabajo del CBQ en su inmediato devenir, siendo también de posible utilización por otras instituciones científicas y académicas de nuestro país cuyo principal objetivo sea la racionalidad en la obtención de nuevos potenciales candidatos a fármacos. Con el presente trabajo se desarrolla una nueva metodología para la predicción teórica de propiedades físico-químicas y de absorción, mediante su aplicación sobre una familia y un compuesto de interés para la industria farmacéutica cubana.

El presente trabajo de tesis fue realizado en las instalaciones del Centro de Bioactivos Químicos (Universidad Central de Las Villas, Cuba), en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Saskatchewan (Canadá) y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia (España).

CAPÍTULO I
CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Estudios Farmacocinéticos. Aspectos Generales.

1.1.1 Introducción.

La Farmacocinética constituye una ciencia surgida como consecuencia del impulso que experimentaron en todo el mundo los estudios farmacológicos. El término Farmacocinética fue introducido por Dost (1953), aunque los antecedentes reales de esta ciencia deben buscarse a finales del siglo XIX y principios del XX (Alonso y col., 1990).

Para muchos su origen se sitúa en la década del 1930 a raíz de los trabajos publicados por Torsten Teorell (1937a; 1937b), sin embargo su ulterior desarrollo fue lento y no es hasta la década del 1960 cuando la Farmacocinética se desarrolla como ciencia, junto con la Biofarmacia (Alonso y col., 1990).

Aunque existen numerosas definiciones, de una manera simplificada se puede considerar la Farmacocinética como la encargada del estudio de las velocidades de cambio de concentración de fármaco y/o sus metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como de la cinética de las respuestas biológicas correspondientes y de la construcción de modelos adecuados para la interpretación de los datos experimentales (Wagner, 1983).

1.1.2 Procesos ADME. Valoración general.

Las siglas ADME agrupan al conjunto de procesos que un fármaco es susceptible de experimentar en su tránsito por el organismo, ellos son: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción. Los estudios ADME caracterizan la farmacocinética básica del fármaco y por lo tanto, juegan un importante rol en la interpretación de estudios farmacológicos y toxicológicos (Bonal y Domínguez, 1992).

1.1.2.1 Absorción.

La **absorción** se define como el fenómeno de paso de un principio activo o metabolito a través de una barrera fisiológica que separa al medio interior, fundamentalmente la sangre, del lugar de administración (A'íache y col., 1983).

Si bien la absorción por difusión pasiva transcelular suele ser el mecanismo más habitual, un fármaco puede absorberse por otros mecanismos, tales como transporte activo, pinocitosis o el paso a través de pares de iones (Hillgren y col., 1995). Este proceso está condicionado por las

propiedades físico-químicas del fármaco, por factores de la formulación, fisiopatológicos y por otros entre los que se destaca la interacción entre medicamentos (Hillgren y col., 1995).

Desde el punto de vista cinético, la absorción suele ser de primer orden, aunque cuando intervienen procesos de carácter saturable puede ser caracterizada por una cinética no lineal del tipo Michaelis-Menten (Broddie, 1989; Bonal y Domínguez, 1992).

Uno de los parámetros directamente relacionado con la absorción es la *biodisponibilidad* (F), la cual se define como la velocidad y la magnitud con las que se absorbe el ingrediente activo o parte terapéutica de un medicamento desde la forma de dosificación y resulta disponible a nivel del lugar de acción (FDA, 1977; CPMP, 1992)

Respecto a la velocidad, la biodisponibilidad puede definirse utilizando diversos parámetros como son: *concentración plasmática máxima de fármaco* ($C_{m\acute{a}x}$), *tiempo en alcanzar la concentración máxima* ($T_{m\acute{a}x}$) y *constante de velocidad de absorción* (Ka) (Gibaldi y Perrier, 1982; Wagner, 1983). Este último parámetro no está afectado por cambios en la distribución y eliminación del medicamento, por lo que refleja con gran precisión la velocidad de absorción. Como es un tema esencial del presente trabajo, la absorción será analizada con mayor profundidad posteriormente.

1.1.2.2 Distribución.

Por *distribución* se entiende el proceso o conjunto de procesos reversibles mediante los cuales el fármaco libre se incorpora desde la circulación sistémica a los diferentes órganos y tejidos corporales. La capacidad de distribución de los fármacos es muy variable, estando controlada por factores propios del fármaco y fisiológicos (Lanao, 1987; Naranjo y col., 1992).

El *volumen aparente de distribución* de un fármaco (V_z) es uno de los parámetros farmacocinéticos que mejor caracteriza el proceso de distribución y se define como el volumen teórico de los fluidos o tejidos corporales en los que el principio activo se disuelve o fija, respectivamente (Gibaldi y Perrier, 1982; Wagner, 1983; Naranjo y col., 1992). Sin embargo otros parámetros como la unión a proteínas plasmáticas y tisulares y las constantes de velocidad intercompartimentales deben ser considerados para una adecuada interpretación de este proceso.

1.1.2.3 Eliminación.

Los procesos de *eliminación* depuran el fármaco del organismo por biotransformación y excreción. El primer mecanismo conduce a la formación de uno o varios metabolitos los cuales

-Revisión Bibliográfica

son posteriormente excretados (Gudzinowics y col., 1984). Los procesos de excreción permiten la eliminación del fármaco inalterado o de sus metabolitos al exterior, siendo la excreción renal la vía fundamental de eliminación para la mayoría de los medicamentos.

Desde el punto de vista fisiológico los procesos de eliminación por biotransformación siguen una cinética no lineal del tipo Michaelis Menten y los de excreción se caracterizan generalmente, por una cinética de primer orden (Gibaldi y Perrier, 1982; Wagner, 1983; Bonal y Domínguez, 1992). Varios son los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la fase de eliminación, dentro de los que resaltan el *aclaramiento plasmático total del fármaco* (Cl_t), el *tiempo medio de eliminación* ($t_{1/2}$) y la *constante de eliminación del fármaco* (K_e) (Naranjo y col., 1992).

1.1.3 Análisis compartimental.

1.1.3.1 Modelos farmacocinéticos.

Cuando se pretende caracterizar el comportamiento cinético de un fármaco en el organismo, es necesario disponer de la información relativa a la evolución en el tiempo de las cantidades o concentraciones del fármaco en los diferentes órganos y fluidos corporales objeto de estudio.

Los primeros antecedentes de la utilización de modelos compartimentales datan de los inicios del siglo XX, cuando Widmark intentó expresar en lenguaje matemático la relación concentración- actividad (Widmark, 1919). Sin embargo, el resultado más importante de esa época se debe a Teorell que publica en 1937 dos artículos en los que desarrolla teorías básicas, como las de los modelos compartimentales, distribución tisular, etc (Teorell, 1937a; 1937b).

Los modelos compartimentales se basan en considerar al organismo dividido en una serie de compartimentos, cinéticamente distinguibles, en los cuales el fármaco se distribuye de forma homogénea. Paralelamente, existen para cada compartimento una serie de constantes de velocidad, generalmente de primer orden, que controlan los procesos de transferencia del fármaco (Peris-Ribera y Torres-Molina, 1997).

El modelo monocompartimental es el más frecuentemente utilizado, siendo su principal ventaja la buena capacidad de predicción del comportamiento cinético de los fármacos y su inconveniente fundamental, la escasa descripción de la realidad fisiológica (Gibaldi y Perrier, 1982; Wagner, 1983).

Cuando un fármaco se distribuye ampliamente en el organismo deben utilizarse modelos cinéticos más complejos, que lo dividan en varios compartimentos. Dentro de estos modelos

- *Revisión Bibliográfica*

multicompartimentales, el más simple es el bicompartimental, que considera al organismo dividido en dos compartimentos (Riegelman, 1968).

La mayoría de los fármacos administrados por vía intravenosa se definen adecuadamente mediante un modelo bicompartimental. Sin embargo, cuando los fármacos se administran por vía oral es más difícil identificar la fase de distribución, ya que los tres procesos cinéticos (absorción, distribución y eliminación) ocurren simultáneamente. Por esta razón, la cinética de un gran número de fármacos administrados por esta vía se representan adecuadamente por un modelo monocompartimental (Naranjo y col., 1992).

1.1.3.2- Análisis no-compartimental.

Los estudios farmacocinéticos en la actualidad tienden a apartarse del análisis compartimental, ya que ellos envuelven múltiples variables las cuales requieren numerosas muestras sanguíneas por tiempo, para caracterizarlas adecuadamente. Además, el ajuste de la curva depende de la pendiente de la fase terminal, la que frecuentemente se mide utilizando concentraciones plasmáticas próximas al límite de detección del método de análisis. Todo esto ha permitido que últimamente se utilice el análisis de los momentos estadísticos para comprender mejor el comportamiento de un fármaco en el organismo (Yamaoka y col., 1978; Cutler, 1978; Cheng y Jusko, 1988). Los momentos estadísticos son característicos de la forma de las curvas estadísticas de distribución (como las curvas de concentración plasmática en función del tiempo) y son independientes del modelo farmacocinético compartimental.

El tránsito de un principio activo por el organismo es un proceso estocástico. El movimiento de las moléculas individuales, a través del cuerpo, está gobernado por la probabilidad ya que ellas no pueden ser absorbidas, metabolizadas o excretadas al mismo tiempo. Así, el tiempo de residencia del fármaco en el organismo puede concebirse como una distribución de frecuencias con una media y una varianza.

El perfil de concentración plasmática en función del tiempo, luego de una dosis de un fármaco, puede ser considerado como una curva de distribución estadística donde los tres primeros momentos de la curva se definen como: *área bajo la curva* (AUC), *tiempo medio de residencia* (MRT) y *varianza del tiempo medio de residencia* (VRT) (Yamaoka y col., 1978; Cutler, 1978; Benet y Galeazzi, 1979).

1.1.4 Estudios de biodistribución.

Los métodos utilizados para estudiar la biodistribución y metabolismo de fármacos han avanzado grandemente en los últimos 20 años, fundamentalmente a causa del incremento en las exigencias para la evaluación de nuevas entidades químicas.

Los estudios de biodistribución son esenciales para proveer información sobre la distribución y acumulación del compuesto y/o metabolitos, especialmente en relación a sitios potenciales de acción, siendo útil esta información para el diseño de estudios toxicológicos y farmacológicos, y en la interpretación de los resultados de estos experimentos (Francis y James, 1991; ICH Steering Committee, 1994). Además, estos estudios no solamente ayudan a los toxicólogos a encontrar la acumulación de un fármaco en un órgano determinado y explicar la toxicidad para ese órgano, sino que también son importantes cuando valoran la posibilidad de estudios en humanos con el principio activo marcado con un isótopo radioactivo (Francis y James, 1991; ICH Steering Committee, 1994).

1.1.4.1 Técnicas radioisotópicas en estudios de biodistribución.

Los fármacos marcados con isótopos radioactivos son convencionalmente utilizados para facilitar el trabajo experimental en estudios de biodistribución. Los isótopos radioactivos más utilizados en estudios biológicos son el Carbono-14 (^{14}C), Tritio (^3H), Azufre-35 (^{35}S), Fósforo-32 (^{32}P) y Yodo-131 (^{131}I) (Olivares y Aguado, 1986).

El ^{14}C es el radioisótopo preferido debido a que los enlaces C-C en las moléculas orgánicas son acoplamientos fuertes y la posibilidad de pérdida por metabolismo o intercambio químico es mínima en comparación con el ^3H . Además, su vida media de eliminación es de miles de años, es un emisor β débil y es considerado dentro del grupo de baja toxicidad (D), en cuanto a rango de peligro, facilitando el trabajo experimental y su segura manipulación.

La determinación de la pureza radioquímica se realiza por técnicas de Cromatografía de Placa Delgada (utilizando dos o tres sistemas de solventes), Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), etc., y la misma debe ser mayor de un 95% (Nunn, 1992). Después de la síntesis, deben ser tomadas varias consideraciones para minimizar la descomposición del compuesto marcado, dentro de las que se destacan el almacenamiento a bajas temperaturas y la disolución en un solvente adecuado para reducir la autoradiólisis (Francis y James, 1991).

1.2 Absorción de fármacos.

1.2.1 Factores que influyen en la absorción de los fármacos por vía oral.

La administración oral es la vía más natural y por lo tanto, la ruta de aplicación preferida para la mayoría de los agentes terapéuticos orientados a una acción sistémica (Aíache y col., 1983; Chien, 1995). Cuando el fármaco es administrado por esta vía, son varios los factores que pueden influir en su paso a la circulación sistémica y por consiguiente, en la obtención de un efecto terapéutico óptimo. Dentro de estos se destacan los factores físico-químicos de la formulación y del fármaco, y los biológicos (fisiológicos y patológicos) (Ferraito y col., 1992). Todos ellos, en su conjunto, van a desempeñar un papel fundamental en el proceso de absorción de fármacos.

1.2.1.1 Factores físico-químicos de la formulación que influyen en la absorción.

En la actualidad existen diversos tipos de formulaciones que se utilizan por vía oral, dentro de las que se destacan los comprimidos, granulados, cápsulas, polvos, etc. Debido a esto, son varios los factores, especialmente relacionados a los procesos de velocidad, que afectan la absorción del fármaco en el organismo, como son: la velocidad de desintegración, disgregación, liberación y disolución del fármaco desde la forma farmacéutica (Aíache y col., 1983). La velocidad de cada uno de estos procesos será el paso limitante para lograr la absorción del fármaco. En el Anexo 1 se representa un esquema general de la liberación en el organismo de los principios activos a partir de formas orales.

1.2.1.2 Factores físico-químicos del fármaco que influyen en la absorción.

Una vez que el fármaco es liberado de la forma farmacéutica, existen varios factores desde el punto de vista físico y químico que limitan su absorción. Dentro de los factores físicos se debe resaltar la *solubilidad* del principio activo, debido a la estrecha relación con la velocidad de absorción, la cual se pone de manifiesto en la ecuación de Noyes y Whitney (Ansel y Popovich, 1990). También, la *polaridad* y el *grado de ionización* del fármaco son muy importantes para su adecuada solubilidad así como la dependencia del pH (Aíache y col., 1983). Finalmente, el *tamaño de partícula*, la *forma cristalina* y la *constante de disociación* del fármaco son factores que influyen en su disolución y por consiguiente, en su absorción (Amidon y col., 1980; Lachman, 1986).

Dentro de los factores químicos, las propiedades *lipofílicas o hidrofílicas* relativas de la molécula, descritas por el coeficiente de partición, determinan si la misma experimenta una difusión pasiva

-Revisión Bibliográfica

a través del tracto gastrointestinal o de sus membranas biológicas (Wadke y col., 1989). Otro de los factores es la *estabilidad* química la cual debe ser mantenida hasta que el compuesto sea liberado en su sitio de absorción o de aplicación (Wadke y col., 1989).

1.2.1.3 Factores fisiológicos y patológicos que influyen en la absorción de fármacos.

Dentro de los fisiológicos se destacan la *velocidad de vaciamiento gástrico* y el *peristaltismo intestinal*, los cuales influyen, fundamentalmente, en la velocidad de absorción del fármaco (Barr y Riegelman. 1970; Jiménez-Torres y col., 1998). Debido a que los medicamentos no están destinados a personas sanas, sino a aquellas que sufren alguna alteración que da lugar a la aparición de enfermedades, los factores patológicos también van a tener una marcada influencia en la absorción, siempre que exista una patología gastrointestinal. La absorción gastrointestinal de fármacos puede estar modificada como consecuencia de enfermedades de la cavidad oral (*Escleroderma*), del esófago (*Chagas* y *Acalasia*), del estómago (*Aclorhidria* e *Hipoaclorhidria*), del intestino delgado (*Enfermedad Celíaca*, *Inflamatoria del intestino*, *Infecciones gastrointestinales*, *Cirugías*), cardiovasculares (*Cardiopatía isquémica*), hepáticas y renales (Busto y col., 1992; Ritschel, 1993; Goldfinger, 1992).

1.3 Morfología del Intestino.

El intestino delgado es el encargado de la absorción selectiva de la mayoría de los nutrientes como azúcares y aminoácidos, de la digestión terminal y además, sirve como una barrera a las enzimas digestivas, compuestos ingeridos y bacterias (Walker, 1987; Madara y Trier, 1987; Carr y Toner, 1984). Esta característica multifuncional hace que su epitelio sea estructuralmente complejo, tal como se representa en el Anexo 2.

Las células epiteliales son una población heterogénea de células que incluyen: enterocitos o células absortivas; células de copas (goblet), encargadas de la secreción de mucina; células endocrinas; células M, las cuales transportan antígenos presentes en el lumen intestinal a la linfa; células de *paneth*, encargadas de la producción de factores de crecimiento; células de *tuft*, las cuales posiblemente exhiben actividad absortiva, secretora y quimiorreceptiva; y las células de *cup*, las cuales pueden atraer bacterias que se adhieren por mecanismos específicos y son los sitios de enlazamiento para los componentes de la superficie celular de la bacteria (Fenoglio y col., 1999).

-Revisión Bibliográfica

La célula epitelial más común es el enterocito, el cual está altamente polarizado con definidas membranas basolaterales y apicales, que se encuentran separadas por estrechas uniones, según se representa en el Anexo 3. Estas membranas presentan diferencias en la composición proteica y lipídica, lo que justifica sus diferentes propiedades de permeabilidad.

1.4 Mecanismos de transporte de membrana.

Varias son las barreras secuenciales que un soluto tiene que atravesar durante su transporte desde el lumen intestinal hacia la sangre. Se asume, de forma general, que la permeabilidad del fármaco a través del epitelio intestinal, es el paso de velocidad limitante (Artursson y Karlsson, 1991; Fagerholm y Lennernas, 1995) y puede ocurrir tanto por mecanismos paracelulares como transcelulares, según se representa en el Anexo 4. Todas estas rutas y procesos son diferentes, al igual que las propiedades moleculares que influyen en el transporte de fármacos.

1.4.1 Transporte pasivo transcelular.

La membrana celular está compuesta por una doble capa de fosfolípidos y proteínas embebidas y ha sido tradicionalmente bien descrita por el modelo de “mosaico fluido” (Singer y Nicolson, 1972), y más recientemente por uno más complejo, el “modelo de super-enrejado” (Somerharju y col. 1999). La presencia de estos compuestos, brinda propiedades únicas a las membranas celulares del organismo.

El primer paso durante el transporte pasivo transcelular es la penetración del soluto en la membrana apical seguido de su difusión a través del citoplasma de la célula intestinal y finalmente su salida por la membrana basolateral (ver Anexo 4, ruta A). La difusión de solutos pequeños en el citoplasma es normalmente un proceso rápido y por lo tanto, la velocidad de permeabilidad pasiva transcelular está determinada por la velocidad de transporte a través de la membrana apical (Muranishi, 1990). Así, procesos bastante complejos de permeabilidad intestinal de fármacos pueden ser descritos, considerando solamente el transporte pasivo a través de la membrana apical. Debido a ello, los modelos experimentales y teóricos que describen el transporte por este mecanismo han recibido una particular atención (Kramer, 1999; Clark y Pickett, 2000).

1.4.2 Transporte paracelular.

El transporte a través de los poros acuosos de las células epiteliales intestinales, es un proceso conocido como transporte paracelular (ver Anexo 4, ruta C). Diversos estudios refieren los

-Revisión Bibliográfica

mecanismos saturables y sustrato-específicos que operan durante el transporte por esta ruta (Gan y col., 1998; Lee y Thakker, 1999). Sin embargo, éste se considera como un proceso pasivo que sigue la ley de Fick. El transporte por esta vía es mínimo debido a la presencia de estrechas uniones intercelulares (Diamond, 1977; Madara, 1989); solamente pequeñas moléculas hidrofílicas pueden pasar (ver Anexo 4, ruta F), si están presentes moduladores de estas uniones (Hillgren y col., 1995).

1.4.3 Transporte mediado por transportador y por eflujo.

Cuando los solutos son transportados, en la dirección apical-basolateral, por proteínas de la membrana celular (ver Anexo 4, ruta B), a través de mecanismos mediados por transportadores, el proceso de transporte es activo y/o facilitado. Esta vía presenta características específicas como son: especificidad de sustrato, saturabilidad y variabilidad regional (Tanaka y col., 1998). De forma general, los mecanismos mediados por transportadores mejoran la permeabilidad transcelular a un limitado número de fármacos, y su magnitud depende no solamente de la similitud entre el principio activo y el sustrato natural del transportador, sino de la concentración del fármaco y de factores fisiológicos.

Otro proceso de permeabilidad es cuando el soluto se enlaza al receptor en la superficie de la membrana y es luego internalizado por endocitosis (ver Anexo 4, ruta D). Este mecanismo es conocido como transcitosis mediada por receptores. Una vez formada la vesícula, esta se desplaza a la superficie de la membrana opuesta. Esta ruta tiene muy baja capacidad de transporte y es solamente significativa para fármacos macromoleculares que son efectivos a bajas concentraciones (Swaan, 1998).

Contrario a otros mecanismos que promueven la permeabilidad el de flujo polarizado, tiene la potencialidad de limitar la permeabilidad general por bombeo del fármaco en la dirección basolateral-apical (ver Anexo 4, ruta G). La salida del principio activo hacia el intestino es, con frecuencia, atribuida a la Glicoproteína-P y las proteínas asociadas a la resistencia multifármaco (MRP2) en la membrana celular apical (Hunter y Hirst, 1997; Borst y col., 2000; Suzuki y Sugiyama, 2000). La función de este sistema es evitar la incorporación de sustratos tóxicos y facilitar su excreción a través de la mucosa del tracto intestinal (Ambudkar y col., 1999). Aunque un incremento en el número de investigaciones señala el papel del eflujo en la permeabilidad de los fármacos, su relevancia “*in vivo*” aún no ha sido demostrada (Sandstrom y col., 1997).

Resumiendo lo anterior, cuando se diseña un fármaco para que se distribuya ampliamente en el organismo, este debe ser lo suficientemente pequeño para difundir paracelularmente o lo suficientemente lipofílico para pasar a través de las células o ser transportado a lo largo del enterocito intestinal por un mecanismo transportador adecuado (Hillgren y col., 1995).

1.5 Modelos "in vitro" para la predicción del transporte a través de la membrana intestinal. Los estudios "in vivo" de permeabilidad a través de la membrana intestinal en humanos, para nuevos compuestos, son costosos y pueden ser potencialmente dañinos para los voluntarios, si se realizan con productos con una parcial caracterización farmacológica y toxicológica. Tales estudios deben ser desarrollados en animales de experimentación, pero el costo y la capacidad de evaluación restringen el uso de estos experimentos. Varios modelos "in vitro", capaces de predecir la permeabilidad a través de la membrana intestinal para grandes bases de datos de compuestos, han sido desarrollados, brindando un buen entendimiento de los diferentes pasos del proceso de absorción (Ungell, 1997; Artursson y Borchardt, 1997). Su adecuada aplicación dependerá de cuán estrechamente el modelo "in vitro" imite las características de la barrera biológica "in vivo". Dentro de los modelos "in vitro" descritos en la literatura, aparecen desde los más simples de determinación del coeficiente de partición de un fármaco entre un solvente acuoso y uno orgánico (Smith y col., 1975; Paterson y col., 1994), hasta los más complejos basados en cultivos celulares (Artusson, 1990; Artusson y Karlsson, 1991). Algunos de ellos han sido utilizados para desarrollar modelos computacionales y para predecir la permeabilidad intestinal (Artusson y Karlsson, 1991; Yazdanian y col., 1998). Una breve descripción de algunos de estos métodos se muestra a continuación.

1.5.1 Partición en sistemas isotrópicos.

La estructura del n-octanol se parece a la de la mayoría de los lípidos de la membrana celular, los cuales pueden ser descritos como una cadena alquílica con un grupo polar al final de la misma. Esto sugiere, que el transporte de soluto desde el agua hacia el octanol puede modelar el proceso de transporte de soluto hacia la membrana celular. De hecho, el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log P_{o,t/agua}$) correlaciona adecuadamente con la permeabilidad de membrana celular y por lo tanto, ha sido ampliamente utilizado para predecir la velocidad de transporte de membrana (Martin, 1981; Artusson y Karlsson, 1991; ter-Laak y col., 1994; Buur y col., 1996; Ranaldi y col., 1996; Palm y col., 1996; Rubas y Cromwell, 1997; Yazdanian y col.,

1998). Su amplio uso lo ha convertido en la referencia de la lipofilia de un soluto, aunque no describe de forma adecuada la capacidad de formación de puentes de hidrógeno de un compuesto. Antes de que un soluto penetre al interior de la membrana biológica se necesita una completa desolvatación, por lo que la habilidad de permeabilidad del mismo dependerá del número y la fortaleza de los enlaces por puentes de hidrógeno con las moléculas de agua (Stein, 1967; Diamond y Wright 1969). Ya que el $\text{Log } P_{\text{oct/agua}}$ es un pobre descriptor de esta propiedad, se ha evaluado la determinación del coeficiente de partición en un sistema de dos solventes (heptano / etilenglicol), donde uno de ellos pueda formar enlaces por puentes de hidrógeno (Seiler, 1974; Young y col., 1988; Tayar y col., 1992). Aunque algunos intentos exitosos han considerado el valor del $\text{Log } P_{\text{oct/agua}}$ para predecir el transporte de membrana, estos descriptores frecuentemente fallan cuando se utilizan datos experimentales con gran diversidad estructural (Martin, 1981; Artursson y Karlsson, 1991; ter-Laak y col., 1994; Rubas y Cromwell, 1997; Yazdanian y col., 1998).

El coeficiente de partición puede ser también obtenido por métodos computacionales (Sjoberg y col., 1997; Buchwald y Bodor, 1998) y la racionalidad en el uso de este descriptor, para predecir el transporte de membrana, será posteriormente discutida.

1.5.2 Transporte a través de sacos intestinales evertidos.

Varios modelos “*in vitro*” han sido utilizados en la Industria Farmacéutica para evaluar la absorción y su mecanismo en potenciales candidatos a fármacos. Dentro de los modelos empleados se destacan los de tejido excindido (segmentos intestinales aislados, sacos intestinales evertidos, aros intestinales, láminas mucosales con y sin corteza / Cámaras Ussing), las células aisladas, las vesículas de membrana y los modelos de cultivo celular tales como Caco-2, células HT-29 y T84 (Hillgren y col., 1995; Stewart y col., 1997; Barthe y col., 1998, 1999; Le Ferrec y col., 2002). A continuación se muestra una detallada descripción de la aplicación del modelo de saco intestinal evertido, debido a su implicación directa en este trabajo.

Los modelos de tejido excindido comenzaron a ser desarrollados en la década del 1950 (Quastel, 1961). Wilson y Wiseman fueron los primeros en reportar el uso del saco intestinal evertido para estudiar el transporte de nutrientes (Wilson y Wiseman, 1954). Este ha sido utilizado extensivamente para el transporte de fármacos a través del intestino, debido a su fácil preparación y a que no es necesario un equipamiento especializado. Sus aplicaciones son diversas.

--Revisión Bibliográfica

destacándose la utilización en la determinación de parámetros cinéticos con alta fiabilidad y reproducibilidad (Acra y Ghishan, 1991; Barthe y col., 1999), el estudio de transporte de macromoléculas y liposomas para cuantificar el transporte paracelular de moléculas hidrofílicas y estimar el efecto de promotores de la absorción (Leppert y Fix, 1994), la medición de la absorción en diferentes sitios del intestino delgado (Chowhan y Amaro, 1977; Ritschel y col., 1991), el desarrollo de experimentos preliminares en el colon (Davis y col., 1982; Barthe y col., 1999), la estimación del efecto de metabolismo de primer paso de fármaco en el epitelio intestinal (Barr y Riegelman, 1970) y puede ser utilizado (en su variante evertida o no) para estudiar el efecto de la Glicoproteína-P sobre el transporte de xenobióticos a través de la barrera intestinal (Barthe y col., 1999).

A pesar de su amplio uso, una de las principales desventajas de los sacos intestinales evertidos es la presencia de la *mucosa muscularis*, la cual no es usualmente eliminada de las preparaciones de estos sacos. Por lo tanto, este modelo no refleja la verdadera barrera intestinal, por lo que los compuestos en estudio pasan desde el lumen hacia la lámina propia (donde se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos) y posteriormente, a través de la *mucosa muscular is*. Así, el transporte de compuestos con alta capacidad de enlazamiento a las células musculares puede ser subestimado. Por otro lado, como ambas superficies (mucosal y serosal) son expuestas al buffer con el compuesto de interés, la polaridad de la absorción no puede ser determinada. Finalmente, debe considerarse que este tipo de modelo es útil para realizar estudios rápidos de transporte ya que largos períodos de incubación provocan cambios funcionales y morfológicos en el tejido (Hillgren y col., 1995).

1.6 Modelos “*in situ*” para estudios de transporte a través de la membrana intestinal.

Los experimentos “*in situ*” para estudiar la absorción intestinal de fármacos, fueron introducidos por primera vez a finales de la década del 1960 (Doluisio y col. 1969). Posteriormente, Plá- Delfina y Moreno modifican el método anterior, tras un análisis profundo de los resultados obtenidos por otros investigadores donde se menospreciaba la absorción por poros (Suzuki y col., 1970a, 1970b; Wagner y Sedman, 1973; Kubinyi, 1979); luego el modelo bihiperbólico propuesto reivindica el papel de los canales acuosos en la absorción y propone una ecuación explícita para su cuantificación a escala funcional (Plá-Delfina y Moreno, 1981; Martin-Villodre y col., 1986).

Revisión Bibliográfica

Durante todo este tiempo, el desarrollo de modelos "*in situ*" fue una poderosa herramienta para la investigación del transporte intestinal y el metabolismo de fármacos, siendo los dos métodos más ampliamente utilizados el de intestino abierto perfundido (Savina, 1981, Ristchel y col., 1991; Ribadeneira, 1996) y el de lazo cerrado (Grisafe y Hayton, 1978; Poelma y col., 1989; Hisatoshi, 1995; Mirchandani y Chien, 1995). Estas aproximaciones son las más cercanas al sistema "*in vivo*" y son adecuadas para la producción de datos cinéticos, ya que el suministro de sangre y la capacidad de inervación y aclaramiento, permanecen intactas (Fagerholm y col., 1996). Sin embargo, estos métodos tienen la desventaja de no brindar información acerca de eventos a nivel celular o de la membrana, y la medición de la velocidad de disminución de la concentración del fármaco en el perfusato, no siempre representa la velocidad de llegada de este a los vasos sanguíneos, principalmente si ocurren procesos metabólicos presistémicos o intracelulares. Finalmente, el número de animales requeridos, comparados con los métodos rápidos "*in vitro*", es mayor (Barthe y col., 1999).

1.7 Modelos "*in vivo*" para la determinación de la permeabilidad intestinal.

Todos los modelos descritos anteriormente requieren datos "*in vivo*" para su validación, pero la caracterización "*in vivo*" del comportamiento farmacocinético de un fármaco no puede ser considerada durante las fases iniciales de ensayo. Sin embargo, los experimentos "*in vivo*", hasta el momento, seguirán siendo muy necesarios ya que la complejidad del sistema gastrointestinal dificulta la predicción del comportamiento de la absorción de un fármaco.

El sistema de paso-simple en el yeyuno humano parece ser uno de los métodos más promisorios para estudiar los procesos de disolución y permeabilidad del principio activo en un medio "*in vivo*" fisiológico. Un método similar puede ser usado en perros para obtener buenas predicciones, manteniendo las diferencias inter-especies de la membrana intestinal (Bermejo y Ruiz-García, 2002).

1.8 Modelos "*in silico*" para la predicción de la permeabilidad intestinal.

En secciones anteriores hemos visto que los modelos "*in vitro*", "*in situ*" e "*in vivo*" pueden ser útiles para la estimación de la permeabilidad intestinal de fármacos. Sin embargo, prácticamente ninguno de ellos es capaz de predecir de forma rápida esta propiedad para una gran cantidad de nuevos candidatos. Una solución a esta problemática se puede lograr aplicando métodos computacionales apropiados, capaces de establecer relaciones estructura-permeabilidad, los cuales

Revisión Bibliográfica

pueden ser utilizados en cualquier etapa del proceso de descubrimiento y desarrollo de un principio activo.

Varios modelos “*in silico*” (estructura-propiedad farmacocinética), utilizando importantes propiedades moleculares, se han empleado para la estimación temprana de propiedades de disposición de fármacos (Ekins y col., 2001; Podlogar y col., 2001). Los primeros intentos para predecir la biodisponibilidad directamente de la estructura molecular, han sido publicados recientemente (Andrews y col., 2000; Yoshida y Topliss, 2000). Sin embargo, varios estudios “*in silico*” se han reportado para la predicción de la absorción oral (Raevsky y col., 2000; Ertl y col., 2000; Zhao y col., 2001; Norinder y Óstesberg, 2001)

La interpretación de los resultados obtenidos utilizando modelos “*in silico*”, requieren un conocimiento exhaustivo de las propiedades moleculares que determinan el transporte pasivo de fármaco por la membrana intestinal.

1.8.1 Propiedades moleculares que influyen en el transporte pasivo de fármacos.

El transporte pasivo a través de la membrana celular, se describió inicialmente a través de un modelo difusión-solubilidad, donde el transporte procede primeramente por distribución y luego por difusión, de acuerdo a la primera ley de Fick (Stenberg, 2001). Por otro lado, la teoría de partición de pH plantea que solamente las especies no cargadas de compuesto proteolíticos se particionan a través de la membrana (Stenger, 2001). Así, de acuerdo al modelo difusión- solubilidad y a la teoría de partición de pH, la partición membrana-agua, la carga y el tamaño del soluto (asumiendo que la difusión en la membrana es reflejada por el tamaño del soluto) describen el proceso de transporte. Además, se plantea que los solutos antes de entrar en las membranas biológicas requieren una completa desolvatación, lo que significa que este proceso depende del número y la fuerza de los enlaces por puente de hidrógeno que la molécula de soluto pueda formar con el agua (Ungell, 1997; Sandstrom y col., 1997).

No obstante, este modelo simplista falla cuando se tiene en cuenta la naturaleza anisotrópica de la membrana celular (Marrink y Berendsen, 1994). Esta característica ha sido incluida en un modelo en el cual la partición de membrana se considera como un modelo de 2 pasos, el cual se ha aplicado exitosamente para describir el transporte de fármacos (Burton y col., 1992). En este proceso, la lipofilidad constituye la principal fuerza impulsora del soluto hacia la región de los grupos de fosfolípidos. Luego, la transferencia del soluto hacia el intersticio de la bicapa

-Revisión Bibliográfica

fosfolipídica depende, principalmente, de las interacciones energéticamente desfavorables, entre la bicapa y las partes polares de este. El proceso depende, en menor extensión, de la lipofilidad y puede ser grandemente influenciado por la formación de puentes de hidrógeno y la polaridad (Jacobs y White, 1989). Una descripción gráfica de este proceso se representa en el Anexo 5.

Así, tanto la capacidad de formación de puentes de hidrógeno como la lipofilidad pueden ser los mejores descriptores de la permeabilidad del fármaco, dependiendo de cuales de los dos pasos descritos anteriormente son determinantes para la permeabilidad de la membrana.

En conclusión, el proceso de transporte está altamente influenciado por la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, la lipofilidad, el tamaño y la carga del soluto. Un gran número de descriptores relacionados con estas propiedades, pueden ser obtenidos utilizando métodos computacionales.

1.8.2 Generación de descriptores calculados.

El primer paso en el desarrollo de un modelo teórico, para la predicción de la permeabilidad de la membrana, es la construcción de una descripción de la molécula de soluto. En su forma más simple, esta descripción puede ser el número de átomos que componen la misma; sin embargo, no siempre los descriptores simples permiten una adecuada predicción de la permeabilidad y con frecuencia son usados descriptores más refinados.

1.8.2.1 Descriptores basados en una representación bidimensional.

Las moléculas pueden ser representadas por su estructura bidimensional (2D) o por su código SMILES, el cual es un sistema de entrada lineal molecular simplificado (Weininger, 1988; Weininger y col., 1989; Weininger, 1990). Tales representaciones identifican tipos de átomos y grupos funcionales y esta información puede ser utilizada para calcular rápidamente propiedades físico-químicas como capacidad de formación de puentes de hidrógeno (Raevisky, 1997), lipofilidad (Leo y col., 1975; Rekker, 1977) y carga. Además, varios descriptores topológicos pueden ser derivados de la estructura 2D (Hall y col., 1991a; 1991b).

1.8.2.2 Descriptores basados en una representación tridimensional.

Las representaciones 2D ofrecen una información incompleta de la molécula y es por eso que a veces se requieren estructuras tridimensionales (3D) que permiten realizar ordenamientos espaciales diferentes. Las estructuras 3D dependen del ambiente de la molécula y pueden ser obtenidas por el desarrollo de cálculos mecánico-moleculares. Los descriptores generados de

-Revisión Bibliográfica

estructuras 3D son, por lo tanto, únicos para una conformación molecular particular y son considerados como el mejor reflejo de la interacción intramolecular. Descriptores como el área de superficie molecular (Lee y Richards, 1971), el volumen y la lipofilidad, dependiente de la conformación (Testa y col., 1996), pueden ser derivados de las estructuras 3D.

1.8.2.3 Descriptores basados en funciones de onda.

Las estructuras 2D y 3D no proporcionan, generalmente, una descripción precisa de la distribución electrónica de la molécula. Para obtener información acerca de las propiedades de valencia molecular, las moléculas deben ser representadas por funciones de onda, las cuales son generadas por cálculos mecánico-cuánticos. Estas representaciones contienen una gran cantidad de información y permiten calcular cualquier descriptor computacional conocido, aunque consumen gran cantidad de tiempo y desde el punto de vista práctico no se aplican a grandes bases de datos de compuestos.

La estructura 2D es la base para los cálculos mecánico-moleculares o dinámico-moleculares y la estructura 3D se utiliza como entrada para los cálculos mecánico-cuánticos. Estos métodos presentan diferentes niveles de complejidad de la representación molecular.

Descriptores de variada complejidad, pueden ser derivados de cada uno de estos niveles y relacionados con la permeabilidad de membrana por métodos estadísticos apropiados. De esta forma se obtienen modelos predictivos para esta propiedad (Ertl y col., 2000; Cruciani y col., 2000; Ósterberg y Norinder, 2000).

1.8.3 Desarrollo de modelos computacionales.

Durante los últimos 5 años, diversos modelos computacionales (cuantitativos y cualitativos) han sido desarrollados para la predicción de la permeabilidad intestinal pasiva (Stenberg y col., 2000; Clark y Pickett, 2000), los cuales han sido construidos utilizando diferentes aproximaciones, permitiendo realizar diferentes tipos de predicciones.

1.8.3.1 Modelos cualitativos de la permeabilidad de membrana intestinal.

Cuando un compuesto o fármaco ha alcanzado los estudios clínicos Fase II, podemos considerar que es lo suficientemente bien absorbido como para encontrar una demanda clínica y tener otras propiedades comunes a los medicamentos. Tales compuestos pueden ser definidos como *similares a fármacos* (Ajay y col., 1998). Varios modelos cualitativos han sido desarrollados examinando estos compuestos, encontrándose patrones sistemáticos en sus estructuras (Lipinski y

-Revisión Bibliográfica

col., 1997; Ajay y col., 1998; Sadowsky y Kubinyi, 1998; Gillet y col., 1998; Kelder y col., 1999; Frimurer y col., 2000; Wagcner y van Geerestein, 2000; Oprea, 2000).

El modelo cualitativo, probablemente más conocido, es la “Regla de los 5” (Lipinsky y col., 1997). En este modelo se analizaron 2245 compuestos en Fase II de ensayos clínicos y se identificaron 4 descriptores calculados fácilmente, que no excedieron ciertos límites para la mayoría de los compuestos. Estos descriptores fueron el número de enlaces donadores y aceptores de hidrógeno (no más de 5 y de 10 respectivamente), el peso molecular (no mayor de 500) y el coeficiente de partición (no mayor de 5). La “Regla de los 5” establece que si dos o más de estos límites son excedidos, el compuesto en cuestión no será un fármaco (Lipinsky y col., 1997). El mérito de este modelo es la facilidad de determinación e interpretación de los descriptores, lo que justifica su amplio uso. Sin embargo, la relevancia de esta “regla” ha sido cuestionada recientemente debido a la no dependencia de las propiedades evaluadas (Oprea, 2000).

1.8.3.2 Modelos cuantitativos de la permeabilidad de membrana intestinal.

Los modelos cuantitativos han sido desarrollados relacionando la permeabilidad experimental con uno o más descriptores moleculares calculados. Estas relaciones han sido obtenidas utilizando varios métodos estadísticos, que van desde la regresión lineal simple (Palm y col., 1996) hasta los métodos más complejos que involucran redes neuronales (Wessel y col., 1998).

El cálculo de la lipofilidad, la capacidad de formación de puentes de hidrógeno y el tamaño molecular derivado de fragmentos y átomos, fueron de los primeros descriptores utilizados para la predicción de la permeabilidad de membrana (Hansch y col., 1965; Stein, 1967) y han sido, subsecuentemente, correlacionados con algún éxito (Palm y col., 1996; van de Waterbeemd y col., 1996; Oprea y Gottfries, 1999; Raevsky y col., 2000; Platts y col., 2000).

Otros descriptores basados en fragmentos y conteos de átomos, han sido empleados para la descripción del transporte de membrana incluyendo parámetros de solubilidad (Martini y col., 1999), índices electrotopológicos (Norinder y Óstesberg, 2001) y un conjunto de propiedades físico-químicas (Óstesberg y Norinder, 2001). Los resultados obtenidos, usando estos métodos simples, fueron adecuados y comparables a los alcanzados utilizando otros de mayor demanda computacional (Norinder y col., 1997; Norinder y col., 1999).

Las propiedades de superficie molecular, derivadas de cálculos mecánico-moleculares, han sido utilizadas para describir varias propiedades físico-químicas, tales como lipofilidad (Barlow y

-Revisión Bibliográfica

Satoh, 1994; Testa y col., 1996), energía de solvatación (Ooi y col., 1987), y solubilidad (Amidon y col., 1975). Las propiedades de superficie molecular y en particular, el área de superficie molecular polar (PSA), han recibido mucha atención como un descriptor para la velocidad de transporte de membrana (Palm y col., 1996; van de Waterbeemd y col., 1996; Krarup y col., 1998; Winiwarter y col., 1998; Palm y col., 1998; Kelder y col., 1999; Clark, 1999; Goodwin y col., 1999; Ertl y col., 2000). El PSA fue introducido como un descriptor para el transporte pasivo de membrana por van der Waterbeemd y Kansy (1992). Este descriptor está relacionado con la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, y se define como aquella parte del área de la molécula formada por átomos de nitrógeno y oxígeno, más el área de los átomos de hidrógeno unidos a estos heteroátomos (Palm y col., 1996). Este parámetro ha sido modificado para considerar no solamente el PSA de una simple conformación molecular sino, el de todas las conformaciones de baja energía (Palm y col., 1996). El PSA dinámico (PSAd) obtenido por este procedimiento, fue considerado como el mejor reflejo de la flexibilidad conformacional de la molécula y su significación en el incremento de la representación molecular ha sido señalada en varios estudios (Kelder y col., 1999; Clark, 1999). Sin embargo, este parámetro requiere una mayor demanda computacional que el PSA.

El PSA, la lipofilidad y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno han sido utilizadas para construir modelos de permeabilidad intestinal en humanos, basados en mínimos cuadrados parciales (PLS) (Winiwarter y col., 1998), redes neuronales (Wessel y col., 1998), etc.

Por otro lado, está bien establecido que sustituyentes no polares facilitan el transporte de membrana, y que los compuestos que son más hidrofóbicos generalmente tienen mayor permeabilidad de membrana que los compuestos hidrofílicos con propiedades similares de entrelazamiento de hidrógeno (Lundahl y Beige, 1997). Debido a esto, el área de superficie no polar dinámica ha sido considerada en los estudios de permeabilidad de membrana; incluso se han encontrado relaciones de combinación entre el área superficial polar y no polar, con la permeabilidad de membrana (Hidalgo y col., 1989; Conradi y col., 1994).

Otros métodos han sido desarrollados para predecir la permeabilidad a partir de descriptores derivados de estructuras 3D. Uno de ellos es el conocido como MS-WHIM (invariante molecular ponderada con la superficie molecular). Este método utiliza la información contenida en la estructura molecular 3D y condensa esta hacia los descriptores, los que están relacionados con

Revisión Bibliográfica

propiedades físico-químicas fundamentales. Un modelo PLS que describe la permeabilidad en células Caco-2 de 17 fármacos estructuralmente diversos, ha sido desarrollado utilizando el método MS-WHIM (Bravi y Wikel, 2000).

Otro método, basado en lo que se conoce como *hashkeys* moleculares (vectores que capturan información acerca de las propiedades de superficie de la molécula), se ha utilizado para relacionar la información de la estructura molecular con la absorción intestinal de 20 compuestos estructuralmente diversos, usando para ello redes neuronales (Ghuloum y col., 1999).

Descriptores moleculares generados por métodos más complejos, que involucran cálculos mecánico-cuánticos, han sido también empleados para describir la permeabilidad de membrana. Varios descriptores relacionados con propiedades físico-químicas, se han calculado usando tales métodos y luego han sido correlacionados con la permeabilidad en células Caco-2 (Norinder y col., 1999).

En conclusión, un gran número de métodos computacionales se han desarrollado para la predicción de la permeabilidad intestinal de membrana y la absorción intestinal. Sin embargo, la mayoría de los modelos cuantitativos publicados, han sido aplicados sobre pequeños conjuntos de datos, conteniendo compuestos de diversidad estructural limitada, por lo que se hace difícil señalar cuáles de estos modelos proveen las predicciones más precisas de la permeabilidad de membrana intestinal. La selección dependerá de la naturaleza de la información que se requiera, de cuanto esfuerzo computacional se necesite y de la potencia de cómputo con que se cuente.

1.8.4 La aproximación TOPS-MODE.

El TOPS-MODE es el acrónimo de *Topological Substructural Molecular Design*, y consiste en un método de diseño molecular con una base grafo-teórica. La metodología general es de corte fenomenológico, por lo que no necesita del conocimiento de los mecanismos que intervienen en un proceso dado para describirlo, aunque se debe reconocer que la dependencia de una muestra constituye su principal desventaja. La aproximación TOPS-MODE (Estrada. 1996), se fundamenta en el cálculo de los momentos espectrales (descriptores) de la matriz de adyacencia entre los enlaces (E) de un grafo molecular, y representa una promisoría alternativa al diseño racional de fármacos. Estos descriptores, después de implementarse computacionalmente, son aplicados al estudio de relaciones cuantitativas y cualitativas de estructura-propiedad y estructura-actividad biológica.

1.8.4.1 Momentos espectrales (fik)*

Revisión Bibliográfica

El momento espectral de orden k se define como la traza de la k -ésima potencia de la matriz E y su símbolo es μ_k . (Estrada, 1996). A su vez, la traza se define como la suma de los valores de la diagonal principal. Lo anterior se puede expresar matemáticamente de la siguiente manera:

$$\mu_k = \text{Tr}(E^k) = \sum_{i=1}^m k e_{ii} \quad (1)$$

donde, e_{ii} son los elementos de la diagonal principal de la matriz E^k . De la definición dada de μ_k , se observa que los momentos espectrales son números enteros positivos.

Una de las ventajas de los μ_k es que pueden expresarse como combinación lineal del número de veces que aparecen determinados fragmentos (subgrafos) en la molécula (grafo). La expresión matemática general de los μ_k , en función de los fragmentos, puede ser escrita de la siguiente forma:

$$\mu_k = \sum_{i=1}^s k c_i |F_i| \quad (2)$$

donde, al número c_i se le llama contribución del fragmento i al momento espectral de orden k : $|F_i|$ es el número de veces que aparece el fragmento i en el grafo molecular y s es el número de clases de fragmentos que contiene la molécula (Estrada, 1996).

1.8.4.2 Momentos espectrales ponderados

Para lograr diferenciar las moléculas con heteroátomos a través de los momentos espectrales, las aristas del grafo molecular son ponderadas con determinados pesos (d_{ij}), lo que aumenta notablemente las posibilidades y versatilidad del método. Mediante los d_{ij} se pueden introducir de manera natural, en la diagonal principal de la matriz, propiedades estándares de los enlaces como son: la distancia, la polarizabilidad, el dipolo estándar de enlace, la diferencia de electronegatividad entre átomos de un enlace, la hidrofobicidad, la masa atómica, etc.

Las expresiones generales para los momentos espectrales de la matriz de adyacencia entre enlaces, ponderados en la diagonal principal, son análogas a las anteriores sin ponderación, pero algo más complejas (Estrada, 1997a).

1.8.4.3 Descriptores definidos localmente. Momentos espectrales locales

Dentro del conjunto de características que debe poseer un descriptor se encuentra el estar localmente definido (Randic, 1991). La mayor parte de los índices topológicos conocidos pueden ser considerados como descriptores moleculares globales, ya que describen la estructura molecular como un todo. En los inicios del 1990, Kier y Hall (Kier y Hall, 1990; Hall y col., 1991a; Hall y col., 1991b; Kier y Hall, 1999a; Kier y Hall, 1999b) introducen un nuevo índice topológico que denominaron de Estado Electrotopológico (E-estado), basado en invariantes grafo-teóricas y fue considerado como un descriptor molecular local.

Para el caso de los momentos espectrales se han definido unos descriptores análogos a los momentos espectrales totales que poseen propiedades semejantes a los anteriores (Estrada, 1996; Estrada, 1997a; Estrada, 1998a; Estrada y Molina, 2000a). Estos se denominaron momentos espectrales locales de la matriz de adyacencia entre enlaces del grafo molecular desprovisto de hidrógeno, pudiendo estar la matriz ponderada o no en la diagonal principal. Dichos índices fueron definidos y usados en la modelación de propiedades de interés (Estrada y Molina, 2001a), realizándose la formulación matemática de su interpretación, en términos de la contribución de fragmentos a las propiedades locales.

Cada momento espectral local, especialmente para los primeros valores de k , contiene información del fragmento en sí y para valores mayores contiene información sobre el entorno del fragmento considerado dentro del grafo. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que los valores tomados por los elementos (${}^k e_{ii}$) de las diferentes potencias de la matriz E (E^k) son iguales al número de caminos de autoretorno de orden k en que participa el enlace e_{ii} (Estrada, 1997b). Por tanto, a medida que aumenta el orden k influirán, en el valor de la traza, los mayores caminos de autoretorno, por ejemplo:

$$\mu_0(G, F_i) = {}^d \mu_0(G, F_i) = m_i \quad (3)$$

donde m_i es el número de aristas que contiene el fragmento F_i , mientras que:

$${}^d \mu_1(G, F_i) = \sum e_{ii} : e_{ii} \subset C_i \quad (4)$$

o sea, ${}^d \mu_1(G, F_i)$ es la suma de las ponderaciones de las aristas del fragmento F_i .

En general, los momentos espectrales locales pueden describirse como la combinación lineal del número de veces que aparecen los fragmentos que se solapan con F_i en el grafo G :

$$\mu_k(G, F_i) = \sum^k c_{hi} |F_{hi}| \quad (5)$$

donde, kCh_i , es la contribución del fragmento h al k -ésimo momento espectral local del fragmento F_i , y $|F_{hi}|$ es el número de veces que se solapan fragmentos de clase h con el i . Decimos que dos fragmentos se solapan si tienen al menos una arista común.

1.8.4.4 Aplicación general de la aproximación TOPS-MODE.

La aproximación TOPS-MODE ha sido ampliamente utilizada en estudios de relación estructura-actividad (QSAR) y estructura-propiedad (QSPR) (Estrada, 1996; 1997a; 1998a; 2000a; Estrada y Molina, 2000a; 2001a; Estrada y Gutiérrez, 1999a; Estrada y col., 1998; 2000a; 2000b; 2001a; 2001b; 2001c; Estrada y Peña, 2000a; Estrada y Uriarte, 2001a).

Durante la aplicación de la aproximación deben seguirse los siguientes pasos (Estrada y Peña, 2000a; Estrada y col., 2001a; Estrada y Uriarte, 2001a):

- Seleccionar una serie de entrenamiento (SE) de compuestos activos e inactivos (si son estudios QSAR) con gran diversidad estructural, o compuestos con propiedades específicas (si son estudios QSPR).
- Dibujar los grafos moleculares desprovistos de hidrógenos, para todas las moléculas, pertenecientes a la SE.
- Usar pesos de enlace (ponderaciones) apropiados, con el fin de diferenciar las moléculas; por ejemplo: distancia de enlace, dipolos de enlace, polarizabilidad, diferencia de electronegatividad, etc.
- Calcular los momentos espectrales de la matriz de enlace con los pesos apropiados, para todas las moléculas de la SE.
- Encontrar una función clasificadora usando alguna técnica estadística de discriminación, tal como el Análisis Discriminante Lineal (ADL) o la regresión multivariada (ARM):

$$P = a_0 \mu_0 + a_1 \mu_1 + a_2 \mu_2 + \dots + a_k \mu_k + b \quad (6)$$

donde, P es la propiedad o actividad biológica; μ_k , es el momento espectral k -ésimo y a_k los coeficientes obtenidos por la técnica aplicada.

-Revisión Bibliográfica

-Probar la capacidad predictiva del modelo teórico con la aplicación de una serie de predicción (SP) externa, la que es calculada de la misma forma que la SE.

-Calcular las contribuciones de los diferentes fragmentos de interés, con el objetivo de determinar si ellos tienen contribuciones positivas o negativas y sus magnitudes y con la finalidad de presuponer una molécula con características estructurales ventajosas (más activa, menos tóxica, etc.)

1.9 Quinolonas. Propiedades farmacocinéticas y estudios QSAR y QSPR.

Durante la última década un gran número de nuevos agentes antimicrobianos han sido desarrollados y comercializados. Uno de los grupos más importantes son los antibacterianos sintéticos denominados fluoroquinolonas (Rodvold y Piscitelli, 1993; O'Donnell y Gelone, 2000). Estos agentes inhiben el enzima girasa del ácido desoxiribonucleico (ADN), interfiriendo en el enrollado del material cromosómico de la bacteria, lo que le atribuye un amplio espectro de actividad bactericida (Brown, 1996). El átomo de Flúor en la posición 6 y el anillo piperazínico en la posición 7 del esqueleto quinolónico, son esenciales para su espectro antibacteriano y la alta potencia mostrada. Además, ambos grupos afectan las propiedades farmacocinéticas, producen efectos secundarios e inducen, frecuentemente, resistencia bacteriana espontánea (Arreche y col., 1998).

Las características farmacocinéticas de las fluoroquinolonas han sido detalladas recientemente (Bergan, 1998). Todas presentan de moderada a excelente absorción oral y biodisponibilidad. La absorción es generalmente rápida con picos de concentración plasmática entre 1 y 2 horas. La mayoría de las 6-fluoroquinolonas presentan un aclaramiento moderado y tiempos de eliminación entre 4 y 10 horas, mientras que los volúmenes de distribución exceden los 1.5 L/Kg, lo cual es consistente con su significativa distribución a tejidos y células (Turnidge, 1999).

Tomando en consideración que en la práctica clínica la mayoría de las 6-fluoroquinolonas son administradas oralmente, es importante conocer profundamente el proceso de absorción gastrointestinal de estos compuestos. Es por ello que algunos modelos biofísicos, los cuales incluyen parámetros fisico-químicos como la lipofilidad, han sido desarrollados para estudiar el proceso de absorción de estos compuestos (Plá-Delfina y Moreno, 1981; Martín-Villodre y col., 1986; Casabó y col., 1987; Merino y col., 1995; Bermejo y col., 1999).

Por otro lado, las características estructurales de las 6-fluoroquinolonas se han utilizado para predecir su actividad antibacteriana y sus propiedades fisico-químicas y farmacocinéticas (Koga y col., 1980; Ziegler y col., 1990; Bryskier y Chantot, 1995; Escribano y col., 1997; Bermejo y col., 1999).

1.10 Nitrovinilfuranos.

Los compuestos furánicos han sido reconocidos como antibacterianos desde hace muchos años, lo que ha promovido su empleo en la medicina humana y veterinaria, así como en la industria de los alimentos (Chou y col., 1963; Hulbert y col., 1973; Dore y Viel, 1975; Miyagi, 1976; Kelloval y col., 1984). Dentro de los derivados furánicos, los 2-X-5-(2-Y-2-nitrovinil)-furanos son especialmente interesantes debido a su elevada acción bactericida, fungicida y acaricida, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. De hecho, algunos de ellos se han introducido en la industria y han encontrado aplicación en medicina (Gems y Timberlake, 1992; Whitekettle y Donofrio, 1992).

La mayoría de los derivados furánicos descritos en la literatura hasta 1980, poseen un grupo nitro en la posición 5 del anillo furánico, hecho que se fundamenta en la actividad antimicrobiana de este sustituyente en esa posición (Weuffen y col., 1979). El descubrimiento, por varios grupos de investigación, de que los compuestos nitro-aromáticos en general y los nitrofuranos en particular, poseen propiedades mutagénicas y carcinogénicas limitó la aplicación de los compuestos furánicos (Yahagi y col., 1974; McCalla, 1979; 1983; Soska y col., 1981). Estudios posteriores sobre el mecanismo de acción de los nitrofuranos indicaron que estos compuestos actúan como agentes electrofílicos en los medios biológicos (Balaz y col., 1982; Sturdik y col., 1983a; 1983b; Rosenberg y col., 1985; 1987). Los grupos tiol de varias enzimas presentes en los microorganismos, atacan el átomo de carbono a del doble enlace exocíclico a través de una reacción de adición nucleofílica. Este hecho, brindó una nueva oportunidad a estos compuestos ya que se demostró que la presencia del grupo nitro en la posición 5 del anillo furánico no es una condición necesaria para que se manifieste la actividad antibacteriana.

Con relación a los estudios de mutagenicidad de estos compuestos, Sturdik y col. (1985, 1986) demostraron experimentalmente que sólo los derivados con el grupo nitro en la posición 5 del anillo furánico son mutagénicos y que el grupo vinilo probablemente no es el responsable de la actividad mutagénica. Estos estudios fueron corroborados recientemente, a través de una relación estructura-actividad en derivados 2-nitrovinilfuránicos (Estrada, 1998).

Revisión Bibliográfica

Uno de los derivados 2-nitrovinilfuránicos de reciente obtención y que ha manifestado un amplio espectro bactericida-fungicida es el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano, comúnmente denominado G1.

1.10.1 Propiedades generales del G1.

1.10.1.1 Propiedades físico - químicas G1.

El G1 es un fármaco obtenido por vía sintética en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, a partir de la bromación del 2-(2-nitro-vinil)- furano y su fórmula estructural se muestra en la Figura 1.

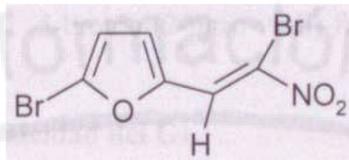


Figura. 1 Fórmula estructural del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano El G1. de fórmula molecular $C_6H_5Br_2NO_2$, tiene una masa molecular de 296.92 y se presenta en forma de polvo cristalino de color amarillo, con un olor característico. Su temperatura de fusión es de 89-90 °C y la pureza establecida para su aceptación está en el rango de 98.00 a 102.00 %. Es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido, acetona y benceno, soluble en tetracloruro de carbono y polietilenglicol 400, poco soluble en metanol absoluto y etanol 90°, difícilmente soluble en etanol 70°, éter de petróleo 40-60° y n-hexano y muy difícilmente soluble en agua (Jorge y col., 1993a).

El análisis estructural, realizado al mismo, por espectrometría de masa, espectroscopia infrarroja en estado sólido, espectroscopia ultravioleta visible y de resonancia magnética nuclear (1H - RMN), así como el estudio cristalográfico por difracción de rayos X, corroboraron la estructura molecular del G1 y su configuración espacial en estado cristalino y en solución (Estrada y col., 1993).

1.10.1.2 Estabilidad del G1.

Un estudio de estabilidad de este principio activo evidenció que la materia prima no sufrió degradación durante los 35 días de exposición a condiciones de humedad del 100, 95, 86 y 76 %; y no presentaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros evaluados en muestras expuestas a la luz durante 91 días. El estudio de estabilidad acelerado por la temperatura, no produjo degradación del G1 durante 89 días a temperaturas de 40, 50, 60 y 70 °C; lo que se

comprobó durante 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente. Los autores proponen como fecha de vencimiento del G1 materia prima, dos años a temperatura ambiente (Jorge y col., 1993b). El G1 es inestable en polietilenglicol 400, etanol absoluto, etanol comercial y 2-propanol, y muestra mayor estabilidad en alcohol bencílico y aceite de Girasol (Landry, 1990). Es estable en acetonitrilo y una mezcla acetonitrilo 80% / agua 20% v/v por, al menos, una semana (York. Medical Project, 1997).

En un estudio sobre los productos de degradación del G1 en mezclas de agua y diferentes solventes a pH ácido, básico y neutro, se demostró la rápida degradación del mismo con la formación de 5-bromofurfural y 5-bromo-(2-nitro-vinil)-furano, principalmente (Molina y Rosado, 1993).

1.10.1.3 Actividad biológica y toxicidad del G1.

El G1 se manifiesta como un potente bactericida-fungicida de amplio espectro en experimentos “*in vitro*” frente a 2703 diferentes microorganismos (Bacterias Gram positivas y Gram negativas aerobias y anaerobias, hongos levaduriformes y filamentosos) (Blondeau y col., 1999). El G1 fue catalogado como ligeramente tóxico en el estudio de toxicidad aguda, por las vías oral y percutánea, en ratas de la línea Sprague Dawley machos y hembras, con valores de la dosis letal media de 1856.3-1506.2 y 2370-2205 mg/Kg de masa corporal; respectivamente (Cortés, 1997). Los estudios subcrónicos durante 30 y 60 días (Dermofural y G1 en petrolato blanco, respectivamente) y crónicos durante 180 días (G1 en aceite/acetona) por vía tópica, no registraron manifestaciones clínicas relacionadas a daños orgánicos de interés toxicológico (Cortés, 1997; Cortés y col., 1997). El riesgo genotóxico del G1 se evaluó por la firma Sitek Research Laboratories de Kockeville (USA), por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Cuba), por la Universidad de Barcelona y por el Centro de Bioactivos Químicos (Cuba). De las 11 pruebas de mutagénesis y/o genotoxicidad realizadas a este principio activo, sólo el test de Ames y el de aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster, CHO (ambos test “*in vitro*”), fueron positivos (Pant y col., 1997). De forma general, los resultados genotóxicos del G1 fueron evaluados por varios expertos internacionales, demostrándose que el mismo permanece clasificado en el nivel de interés de menor riesgo, sin evidencias de genotoxicidad “*in vivo*” (French, 1996; Craig, 1998; Marcos, 1999).

Los estudios relacionados con la farmacocinética del GI han sido muy limitados y algunos de ellos se están realizando actualmente. Cabrera y col. (2001), desarrollaron estudios preliminares de penetrabilidad del GI en una crema de uso tópico (Dermofural), utilizando el principio activo marcado con ^3H . Un estudio preliminar de biodisponibilidad oral en perros, empleando la dispersión sólida de GI en PEG 6000, fue realizado por Ramírez y col. (1994).

1.11 Conclusiones Parciales.

1- Del estudio bibliográfico del tema se puede plantear que de los procesos farmacocinéticos, la absorción es una de las etapas que con mayor peso limita la conversión de una nueva entidad molecular en un medicamento de administración oral.

2- Del estudio bibliográfico se aprecia que existen variados métodos "*in vitro*", "*in situ*" e "*in vivo*" para el estudio del proceso de absorción. Sin embargo, con ninguno de ellos es posible evaluar masivamente y de forma rápida las nuevas entidades moleculares obtenidas por métodos de tamizaje masivo.

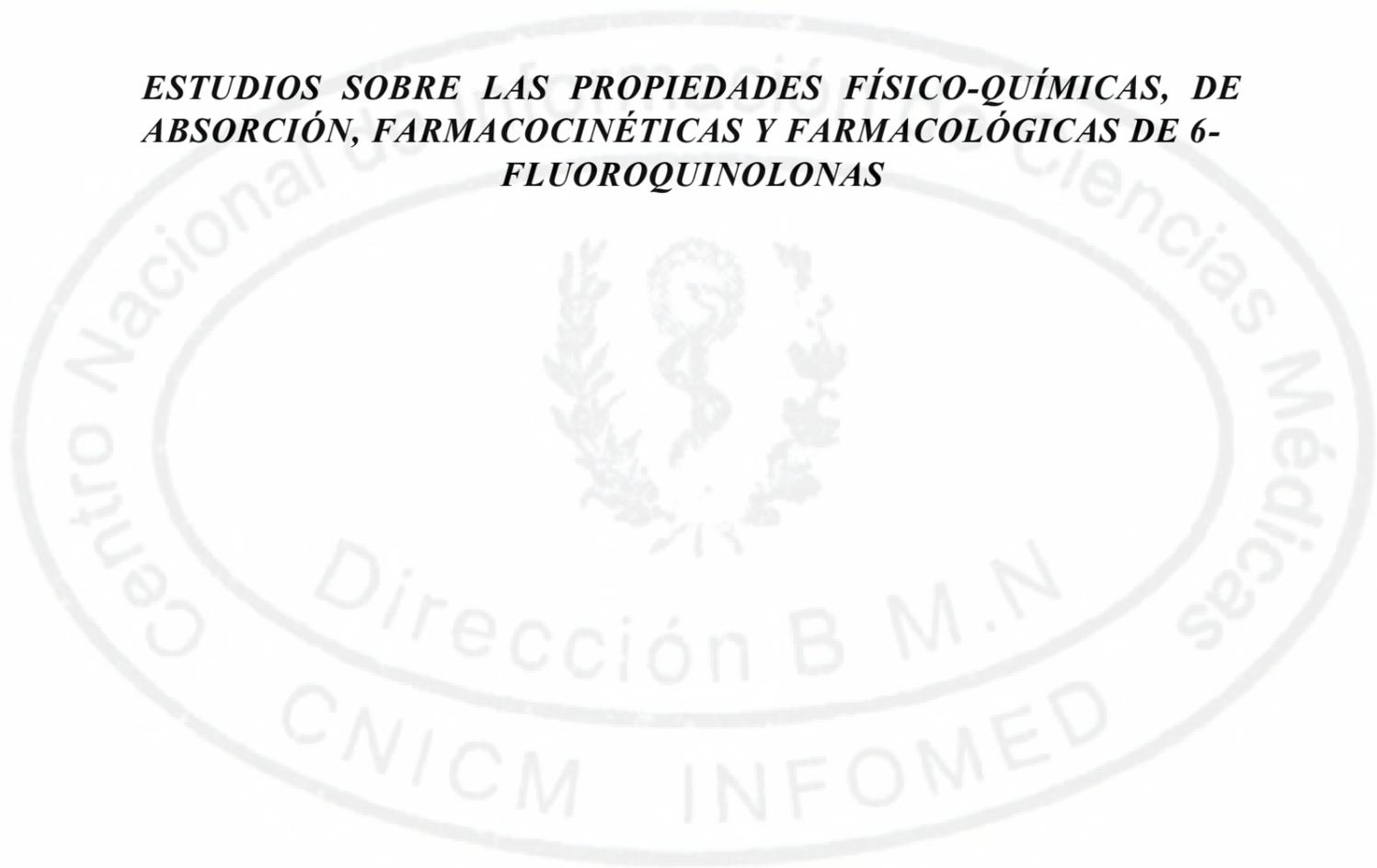
3- Existen varios modelos "*in silico*", cualitativos y cuantitativos, para la predicción de la absorción y la permeabilidad intestinal, sin embargo la mayoría de los modelos publicados han sido aplicados sobre pequeños conjuntos de datos, conteniendo compuestos de diversidad estructural limitada.

4- Del estudio bibliográfico se desprende que la aproximación TOPS-MODE es uno de los métodos topológicos "*in silico*" con más potencialidades de aplicación en la predicción computacional del proceso de absorción de fármacos debido a:

- Presenta una rápida capacidad de cómputo
- Brinda información estructural de fácil interpretación
- Permite realizar estudios de contribuciones de fragmentos a las propiedades evaluadas
- Permite el cálculo de propiedades físico-químicas estrechamente relacionadas con el proceso de absorción.

CAPÍTULO II
CAPÍTULO II

***ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, DE
ABSORCIÓN, FARMACOCINÉTICAS Y FARMACOLÓGICAS DE 6-
FLUOROQUINOLONAS***



CAPÍTULO II.

ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, DE ABSORCIÓN, FARMACOCINÉTICAS Y FARMACOLÓGICAS DE 6-FLUOROQUINOLONAS.

2.1 Materiales y Métodos.

2.1.1 Aproximación TOPS-MODE.

Se basó la utilización de la aproximación TOPS-MODE (Gutiérrez y Estrada, 1997) en el cálculo de los momentos espectrales de la matriz de adyacencia de enlaces con hidrógenos suprimidos, utilizando los momentos dipolo de enlace y la diferencia de electronegatividad (DE), entre los átomos que forman el enlace, como ponderación en la diagonal de entrada de la matriz (Estrada y col., 1998, Estrada, 1996, 1997a, 1998, 1998a, 2000a, Estrada y Gutiérrez, 1999a). Así, fueron obtenidos los descriptores moleculares, representados por los 15 primeros momentos espectrales. Para el estudio de las propiedades físico-químicas y de absorción, se determinaron los momentos espectrales locales sobre el anillo piperazínico (anillo 1) y sobre éste y el sustituyente en Ni. Estos índices fueron llamados respectivamente, el *i*-ésimo momento del anillo piperazínico (μ_{iL-PR}) y el momento local general (μ_{iL}). Este último índice se calculó como sigue $\mu_{iL} = \mu_{iL-PR} + \mu_{iL-N1sust}$. Debido a la influencia de los enlaces de hidrógeno sobre las propiedades físico-químicas y de absorción, se definieron los momentos espectrales de hidrógeno (μ_{iH}) como la traza sobre las aristas hidrógeno-heteroátomo.

Para estudiar las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas se determinaron los momentos espectrales totales (μ_i) y locales sobre los diferentes anillos del esqueleto quinolónico, como se puede apreciar en el Anexo 6. Los índices se denominaron μ_{i-R1} , μ_{i-R2} y μ_{i-R3} para el primero, segundo y tercer anillo de las 6-fluoroquinolonas, respectivamente.

Debido a la influencia del área superficial polar (PSA), así como de la capacidad de formación de puentes de hidrógeno sobre la absorción (Palm y col., 1996; Palm y col. 1998; Kelder y col, 1999; Clark, 1999), se determinaron los momentos espectrales locales sobre los grupos polares (μ_{i-pA}) y no polares (μ_{i-NPA}) de las moléculas. Los momentos espectrales locales sobre los grupos polares fueron calculados sobre los enlaces N-H y O-H y los de los grupos no polares se obtuvieron por diferencia entre los momentos espectrales totales y los polares. Se calcularon los primeros 15 momentos espectrales para cada índice y la selección tuvo en consideración la tendencia a la colinealidad, a medida que se incrementaba el orden de los descriptores (Estrada y col., 1998). El

chequeo de la multicolinealidad de los descriptores incluidos en todos los modelos obtenidos se realizó correlacionando cada descriptor con el resto de los descriptores presentes en el modelo y utilizando un valor de corte de 0.9 para el coeficiente de correlación (Ball y Jurs, 1993; Wessel y Jurs, 1994).

2.1.2 Métodos Estadísticos.

2.1.2.1 Regresión Lineal Múltiple

Se desarrolló una relación cuantitativa entre las propiedades físico-químicas y de absorción (variable dependiente) con los momentos espectrales (variables independientes), utilizando técnicas estadísticas de regresión lineal. Los momentos espectrales, incluidos en la ecuación, fueron seleccionados por un procedimiento de “*paso hacia adelante*”.

La calidad estadística de los modelos se determinó a través del coeficiente de correlación (R), el coeficiente de determinación (R^2), la desviación estándar de la regresión (S), la razón de Fisher ($F_{exp} > F_{tab-0} = 0.05$) y el número de variables en la ecuación. La predictibilidad del modelo fue corroborada a través de una validación cruzada “*dejando uno fuera*” y calculando el coeficiente de determinación y la desviación estándar (R y S_{cv}). En este procedimiento el modelo se construye después de eliminar un compuesto y el modelo resultante es utilizado para predecir la propiedad del compuesto eliminado. El procedimiento se repite hasta obtener una predicción para cada derivado.

2.1.2.2 Análisis de Factores.

Este análisis permite reducir el número de variables originales (normalmente un número grande) a un número menor (factores principales), los cuales resumen la información de las variables iniciales. El análisis de factores utiliza un estimado de la varianza común entre las variables originales para generar el primer factor. El factor es una combinación lineal de las variables originales y estos son siempre ortogonales (Jackson, 1991).

Para estudiar la influencia de los efectos electrónicos y estéricos sobre las propiedades físicoquímicas y de absorción se realizó un análisis de factores, utilizando el programa STATISTICA 5.5 (1999). Para ello, se analizaron las contribuciones normalizadas de grupo en las posiciones R_4 y R_5 del esqueleto 6-fluoroquinolónico, como se puede ver en el Anexo 6. Las contribuciones sobre la n-Metilciprofloxacin, fueron calculadas tomando la diferencia entre la propiedad predicha para la molécula con los sustituyentes en las posiciones específicas, y la contribución de

su propio esqueleto estructural. Su relación con las constantes de Hammett (σ_m y σ_p), Hansch (Π), refractividad molar (RM) y el parámetro estérico principal STERIMOL (L) (Kubinyi, 1993), también fue determinada por esta metodología.

2.1.2.3 Análisis Discriminante Lineal.

El análisis discriminante es una técnica multivariada de dependencia, como la regresión lineal múltiple. La diferencia inicial consiste en que la variable dependiente o criterio es una variable no métrica (categórica). Este análisis se usa para determinar qué variables diferencian dos o más grupos mutuamente excluyentes.

Como un primer paso para obtener una función capaz de predecir los valores de biodisponibilidad en humanos (parámetro farmacocinético) en la serie de 6-fluoroquinolonas analizadas, se desarrolló una función discriminante a través del Análisis Discriminante Lineal (ADL), que permitió la clasificación de las moléculas con valores altos y moderados de esta propiedad. El criterio de clasificación para la función discriminante fue seleccionado, de acuerdo a lo planteado por otros autores (Palm y col., 1997), de la siguiente forma: si el compuesto tiene una biodisponibilidad oral $\geq 90\%$ es un fármaco bien absorbido (alta F) y si el valor está entre 90% y 30%, el fármaco se absorbe de forma moderada. Además, la validación del modelo se desarrolló por un procedimiento de validación cruzada (“dejando uno fuera”).

La función discriminante se obtuvo a través de un ADL utilizando el programa STATISTICA 5.5 (1999). Las variables incluidas en la ecuación del modelo fueron seleccionadas a través de un procedimiento de “*paso hacia adelante*”.

La calidad estadística del modelo se determinó por el análisis de la lambda de Wilks (λ), que permite evaluar la hipótesis de que dos o más grupos provienen de poblaciones con las mismas medias para un conjunto de variables. También se calculó el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (D^2) como criterio para determinar la existencia de dos poblaciones, la razón de Fisher ($F_{exp} > F_{tabb}$, $\alpha = 0.05$) y el número de variables en la ecuación.

2.1.2.4 Estimación no lineal: Regresión lineal Piecewise.

Como un segundo paso para diferenciar el grupo de alta biodisponibilidad del de moderada y a su vez obtener valores cuantitativos en humanos de este parámetro, en el estudio de predicción de propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de 6-fluoroquinolonas, se desarrolló un modelo de regresión lineal Piecewise. Con este procedimiento se llegó a un modelo (por mínimos

cuadrados), donde se obtuvieron dos ecuaciones de regresión lineal separadas; una con valores de la propiedad menores o iguales al punto de ruptura y otra con valores superiores a éste (McGee y Carleton, 1970).

El procedimiento de estimación utilizado fue *Simplex* y *Quasi-Newton*. El punto de ruptura seleccionado fue 90, ya que es la frontera entre las 6-fluoroquinolonas con alta y moderada biodisponibilidad, como se seleccionó en el análisis discriminante previo (acápite 2.1.2.3). Los parámetros estadísticos considerados fueron el coeficiente de correlación (R), el de determinación (R^2) y el número de variables en la ecuación.

2.1.2.5 Procedimiento de selección de outliers.

La detección de *outliers* estadísticos es una tarea importante en la validación de un modelo que puede además aportar importantes evidencias sobre características importantes de ciertos compuestos de la muestra. Los *outliers* son puntos que se desvían significativamente del modelo encontrado, afectando los parámetros estadísticos del mismo. Las técnicas utilizadas para detectar este tipo de desviación fueron: los análisis de los residuales estandarizados, los residuales studentizados, el método de *Leverage*, la estadística DFITS y la distancia de Cook.

Los residuales son las diferencias entre los valores de la actividad observada experimentalmente y de las calculadas por el modelo. Los residuales estandarizados son aquellos divididos por la desviación estándar de la ecuación de regresión. Los residuales studentizados son los residuales divididos por la desviación estándar de la propia observación. El *leverage* es igual a la distancia de Mahalanobis dividida por $n-1$. Esta es una medida de la influencia que tiene una observación sobre el ajuste de la regresión. La estadística DFITS se usa para describir las diferencias en el ajuste de la ecuación causada por la exclusión de una observación. Finalmente, la distancia de Cook es una medida de cómo la omisión de una observación influirá sobre los residuales de todos los demás casos, esta es una medida de la influencia de los casos sobre la regresión.

2.1.3 Relación entre la Farmacocinética y la actividad Farmacológica.

Tomando en consideración que durante el desarrollo de una NEM es necesario realizar varios estudios preclínicos antes de los clínicos, es muy importante que previamente se lleven a cabo estudios farmacocinéticos en animales. Por esta razón, en el estudio de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de las 6-fluoroquinolonas se realizó una segunda validación de los modelos teóricos obtenidos (ADL y Piecewise), a través de una correlación entre la

6Fluoroquinolonas

biodisponibilidad predicha en humanos por los modelos “*in silico*” y los valores experimentales de biodisponibilidad en ratas. La racionalidad de esta aproximación se basa en el buen comportamiento predictivo de este modelo animal para los valores de permeabilidad y de la fracción oral absorbida en humanos (Lennernas, 1997; Stewart y col., 1995). La regresión lineal anterior se obtuvo para 6 compuestos cuyos valores han sido reportados (Ciprofloxacina, Norfloxacina, Pefloxacina, 4n-Propilnorfloxacina, 4n-Propilciprofloxacina y Balofloxacina). Posteriormente se obtuvieron los valores de biodisponibilidad para la CNV 97100, CNV 97102 y CNV 97104 (nuevas 6-fluoroquinolonas en estudios preclínicos), a través de la ecuación de la regresión lineal anterior, y se compararon con los valores predichos originalmente.

Para diseñar nuevas 6-fluoroquinolonas con adecuadas propiedades farmacocinéticas y farmacológicas, debe ser considerada la influencia de diferentes fragmentos y sustituyentes sobre el esqueleto 6-fluoroquinolónico. Una vez obtenido el modelo de regresión lineal para la descripción de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI90) contra *Streptococcus pneumoniae*, según procedimiento descrito en el acápite 2.1.2.1, validado y de acuerdo a las variables incluidas en el mismo, se seleccionó la Sitafloxacina (debido a sus buenas propiedades farmacocinéticas y farmacológicas) y se evaluaron 13 sustituyentes en dos posiciones de su esqueleto. El criterio de selección se basó en los resultados obtenidos por la ecuación de clasificación (biodisponibilidad) y de regresión lineal (farmacológica), como se describió anteriormente.

2.1.4 Datos experimentales utilizados en los estudios teóricos.

Para el estudio de predicción de las propiedades físico-químicas y de absorción de las 6- fluoroquinolonas, 30 compuestos formaron el grupo de datos, 26 se utilizaron en la predicción del coeficiente de partición y 20 para la constante de velocidad de absorción y la permeabilidad intestinal. Diez compuestos se utilizaron como serie de predicción externa (sólo 4 para Log P) y la Sarafloxacina y la Esparfloxacina formaron el grupo de validación externo (ensayo experimental) del modelo predictivo desarrollado (Escribano y col., 1997; Bermejo y col., 1999; Zlotos y col., 1998; Ooie y col., 1996; Jaehde y col., 1992).

La serie de predicción externa estuvo conformada por compuestos que no formaron parte de la serie utilizada para la obtención del modelo teórico y el grupo de validación externo fueron compuestos a los cuales se les predijo la propiedad estudiada y se corroboró experimentalmente, brindando un fuerte criterio de validación del modelo teórico.

-6 Fluoroquinolonas

Para el estudio de predicción de propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de 6- fluoroquinolonas 24 compuestos conformaron el grupo de datos. De ellos, 17 fueron utilizados como serie de entrenamiento en la predicción de la biodisponibilidad y 7, como serie de predicción externa. Los datos de biodisponibilidad (humanos y ratas) fueron tomados de la literatura (Turnidge, 1999; Pickerill y col., 2000; Sharma y col., 1994; O'Grady y col., 2001; Fitton, 1992; Sánchez-Castaño y col., 2000; Ishigai y col., 1995) y determinados experimentalmente “*in vivo*” en ratas, para dos de las 6-fluoroquinolonas pertenecientes a la serie de predicción externa (CNV 97102 y CNV 97104). En este estudio, la biodisponibilidad representa el porcentaje de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica después de la administración oral, por lo que los valores utilizados incluyen todas las pérdidas pre-sistémicas como degradación química en el tracto gastrointestinal, así como el efecto de primer paso intestinal y/o hepático.

2.1.5 Estudios experimentales de absorción.

2.1.5.1 Compuestos de ensayo.

Para la validación experimental del estudio de predicción de las propiedades fisico-químicas y de absorción se utilizaron la Sarafloxacin y la Esparfloxacin como serie de predicción externa de los modelos propuestos. Cada compuesto se identificó por su espectro infra-rojo (IR) y su pureza se corroboró por HPLC (> 99.9%). Los compuestos tuvieron un valor de pK_{a1} entre 5.5 y 6.5, y un pK_{a2} entre 7.5 y 8.8. Ellos estaban en forma de zwitterion al valor del pH de trabajo.

En el estudio de predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas se utilizaron dos nuevos derivados 6-fluoroquinolónicos en estudios preclínicos, la CNV 97102 y CNV 97104.

2.1.5.2 Técnica biológica de determinación de la absorción intestinal “*in situ*”.

Se desarrolló una técnica “*in situ*” de intestino de ratas según el método de Doluisio modificado (Plá-Delfina y Moreno, 1981; Martin-Villodre y col., 1986), utilizando el intestino delgado completo de ratas machos Wistar (210-295g, seis animales por compuesto). Una solución salina isotónica fue preparada y ajustada a pH 7.00 adicionando 10 % (v/v) de una solución 0.066M de buffer fosfato Sorensen. Esta concentración evita los efectos de disrupción que sobre la membrana tienen los fosfatos (Murishita y col., 1973). Las soluciones de prueba se prepararon inmediatamente antes de usarse. Las concentraciones (120 $\mu\text{g/mL}$ para la Esparfloxacin y 5 $\mu\text{g/mL}$ para la Sarafloxacin) fueron lo suficientemente bajas para evitar la precipitación durante

la absorción. Las muestras de perfusato se colectaron después de 5 minutos a intervalos de 5 hasta 30 minutos. Todas las muestras se analizaron inmediatamente.

Soluciones de Lavado

Solución A

Es una solución isotónica empleada para eliminar del intestino los restos sólidos (quimo) y otros desechos. Su composición es:

NaCl— 9 g

KCl 0.34 g

CaCl₂·2H₂O ----- 0.19 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O- 0.76 g

H₂O destilada----- 1 L

Solución B

Se utiliza para condicionar la mucosa intestinal antes de los ensayos de absorción. Está compuesta por suero fisiológico regulado a pH = 7, mediante una solución de tampón fosfato según Sorensen, a razón de 10 mL de tampón por litro de solución. La composición es:

NaCl----- 9 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 1/15 M—3.9 mL

Na₂HPO₄ 1/15 M 6.1 mL

H₂O destilada----- 1 L

Se comprueba siempre su pH final antes de su perfusión y en caso de ser necesario, se ajusta con NaOH 1 N ó HCl 1 N hasta conseguir un pH = 7.

Método de Doluisio modificado

El procedimiento experimental seguido fue el siguiente:

- 1- Luego de un ayuno entre 16 y 20 horas los animales se anestesiaron intraperitonealmente con uretano y luego de 45 minutos (anestesia profunda) el animal se colocó a 25 °C para evitar la disminución de la temperatura corporal al perder la actividad muscular.
- 2- Se colocó el animal en posición decúbito supino y se abrió la cavidad abdominal 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides, luego se separaron los rectos abdominales cortando por la línea alba para evitar hemorragias.

~6 Fluoroquinolonas

- 3- Se localizó el duodeno y se ligó el conducto biliar (colédoco) para evitar el paso de la secreción biliar al intestino (ciclo enterohepático).
- 4- Próximo al duodeno se hizo un corte de bisel y se introdujo un extremo de la cánula de vidrio acodada, fijándose con hilo de seda. El otro extremo de la cánula se conectó mediante un tubo de polietileno a una llave de tres pasos. La misma operación se realizó en el íleon.
- 5- El intestino se lavó con solución A para eliminar restos sólidos y luego con solución B para acondicionar la mucosa, garantizando que la mucosa quede libre de quimo y sales biliares que actuarían como tensoactivos. Las soluciones de lavado deben estar termostalizadas a 37 °C.
- 6- Se extrajo toda la solución B y se conectó la cánula a una llave de tres pasos y a la jeringuilla en posición vertical. Luego se bombeó aire en ambas direcciones para intentar eliminar el máximo de solución B, aunque realmente queda alrededor de 0.7 mL (Martín- Villodre y col., 1986).
- 7- Para evitar la desecación de la cavidad abdominal, se humedeció el mismo con un algodón con suero fisiológico y se fue renovando durante el ensayo para evitar que se enfriara y disminuyera el riego mesentérico.
- 8- En la jeringuilla duodenal se colocaron 10 mL de la solución a profundir, manteniendo la llave de tres pasos en posición intestino-exterior. Se colocó la llave en dirección intestinal y presionando ligeramente el émbolo, para evitar dañar la mucosa, se introdujo la solución a profundir. Mientras tanto, la llave ileocecal se mantuvo abierta para que el aire contenido en el intestino sea desplazado al exterior y sustituido por la solución sin provocar una distensión excesiva de la pared intestinal. Una vez introducida toda la solución se puso en marcha el cronómetro y se colocaron las dos jeringuillas en posición exterior, consiguiendo con esto que el intestino se convirtiera en un compartimiento estanco, ocupado por la solución profundida.
- 9- La toma de muestra se efectuó cada 5 minutos, de forma alternada por cada una de las jeringuillas. El volumen de muestra a tomar en cada intervalo fue de 200 μ L. Durante la toma de muestra se colocó en cada extremo un tubo de centrifuga para recoger con exactitud la solución que podía perderse, ya que es necesario conocer el volumen de

líquido remanente en el intestino al finalizar el ensayo de absorción. El tiempo de toma de muestra no superó los 30 segundos. Después de tomar la última muestra se extrajo del intestino todo el líquido remanente y se midió el pH final y el volumen de la solución.

10-Finalizando el ensayo se sacrificó el animal.

2.1.5.2.1 Corrección de la reabsorción de agua.

La reducción en el volumen de las soluciones de perfusato al final del experimento fue significativa (hasta un 20%), por lo que se hizo necesario realizar una corrección. La reabsorción de agua se caracterizó por un proceso aparente de orden cero (Martín-Villodre y col., 1986; Gabus-Sannié y Buri, 1987). Se empleó el método basado en la medición directa del volumen remanente de la solución de ensayo (Martín-Villodre y col., 1986). Se determinó el volumen al inicio del experimento (V_0) para cada compuesto (en grupo de tres animales), mientras el volumen final (V_t) fue medido sobre cada animal utilizado. La concentración de la muestra fue corregida como sigue:

$$At = Ce. \frac{V_t}{V_0} \quad (7)$$

donde. At es la concentración en el tracto intestinal que habría en ausencia de procesos de reabsorción de agua.

Los valores de At se utilizaron para calcular la actual constante de velocidad de absorción.

Ensayo de reabsorción

Este proceso de reabsorción de agua se caracterizó de forma individualizada, determinando el volumen de líquido remanente después de la realización del ensayo de absorción.

Se desconectó la cánula de la jeringuilla distal y con la que quedó conectada se tomó aire y se ejerció presión, de forma que se extrajo el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente, se separó el tramo intestinal canulado y se cortó el mesenterio, separando el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino con ayuda de un algodón se presionó de principio a fin, asegurando su completo vaciamiento. El volumen recogido se centrifugó durante 15 minutos a 3000 revoluciones por minuto (r.p.m.) para que sedimenten los restos de mucosa que se habían arrastrado. Tras retirarlos se midió el volumen recuperado. Para determinar el volumen de solución remanente al finalizar el ensayo de absorción hay que considerar además, el volumen de las muestras extraídas para la valoración y las pérdidas de líquido que se producen durante el ensayo, que fueron recogidas en un tubo.

2.1.5.2.2 Constante de velocidad de absorción “*In Situ*” y coeficiente de permeabilidad aparente.

El proceso de absorción de todos los compuestos ensayados, a las concentraciones utilizadas, se ajustó a una cinética aparente de primer orden.

$$\frac{dA}{dt} = -K_a \cdot A \quad (8)$$

A través de una linealización de esta ecuación se obtuvieron los valores preliminares de K_a y A_0 que sirvieron como estimaciones iniciales para determinar las constantes de velocidad de absorción de los compuestos, por regresión no-lineal por mínimos cuadrados de las concentraciones remanentes vs tiempo (Sigma Plot 2.0, Jandel Scientific), basado en el algoritmo de Marquardt.

Para evitar la adsorción en la mucosa intestinal y los efectos de dilución de la muestra residual (Martín-Villodre, 1986; Doluisio y col., 1970), solamente se utilizaron para la regresión los valores calculados después de 5 minutos. Los valores de permeabilidad intestinal se calcularon por la relación entre la constante de absorción (K_a) y el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{eff}):

$$P_{eff} = \{K_a \cdot R\} / 2 \quad (9)$$

donde, R es el radio del segmento intestinal profundido.

2.1.5.3 Estudios de absorción: Biodisponibilidad “*in vivo*”.

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 270-315 g y tres meses de edad. Veinticuatro horas antes del experimento, todos los animales se canillaron permanentemente en la vena yugular, a través de una técnica previamente validada (Torres-Molina y col., 1992), para facilitar la toma de muestras de sangre así como la administración intravenosa en los animales no anestesiados. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos (entre 8 y 12 ratas), dependiendo de la ruta de administración, y recibieron una perfusión bolus-intravenoso de 4 ó 8 mg, en dependencia de la quinolona (CNV 97102 y CNV 97104), o una administración oral de 4 ó 8 mg, ambos disueltos en una mezcla de propilenglicol y solución salina (50/50 v/v) para evitar la precipitación.

Se tomaron muestras de sangre (0.4-0,5 mL) con jeringuillas heparinizadas y restituida por solución salina heparinizada (10 U.I./mL) a intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240,

300, 360 y 420 minutos. El plasma fue separado inmediatamente por centrifugación (8000 rpm por minuto) y congelado a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Técnica experimental de determinación de la biodisponibilidad.

La técnica quirúrgica empleada consistió en la implantación de un catéter de silicona en la vena yugular de la rata de forma permanente (Harms y Ojeda, 1974; Torres-Molina y col., 1992). De esta forma se pueden obtener muestras plasmáticas de forma sencilla, a tiempos prefijados, sin sufrimiento para el animal y sin tener que recurrir a la anestesia en cada toma de muestra. El animal, por tanto, permanece durante todo el experimento en su jaula, con libre acceso al agua y la comida.

El catéter se preparó a partir de un tubo de silicona (0.025 "x 0.047"). Para su elaboración se separó un trozo de tubo de unos 20 cm de longitud. Uno de los extremos se cortó en forma de bisel, para facilitar la implantación en la vena yugular. A 3.6 cm de este extremo se fijó un hilo de seda de unos 10 cm, con la ayuda de un sellador de silicona, que sirvió para sujetar el catéter en la rata. El catéter así preparado se mantuvo en la estufa, a elevadas temperaturas, durante unos 20 minutos, con el fin de evaporar el disolvente de la silicona y endurecerla.

El animal se anestesió por inyección intraperitoneal y se colocó en posición de cúbito supino, fijándose las extremidades. Se localizó la zona en la que se perciben las pulsaciones de las venas yugulares, que se impregnan con povidona yodada al 10 % y se realizó una incisión de 1 cm aproximadamente. Luego, se separaron las capas de tejido subcutáneo hasta dejar al descubierto la vena yugular. A continuación se procedió a la exteriorización de la cánula, para la cual se desbridó un tramo subcutáneo hasta la zona cervical, utilizando un trocar, garantizando que la cánula quedara en la posición dorsal fuera del alcance del animal.

El extremo exteriorizado de la cánula se conectó a una jeringuilla de insulina llena de suero fisiológico heparinizado, lo cual permitió llenar el catéter con suero e impidió la entrada de aire al torrente circulatorio.

A continuación se pasó un hilo por debajo de la yugular, facilitando la implantación de la cánula o catéter y disminuyendo la hemorragia en el momento de la incisión. Luego se realizó un pequeño corte de alrededor de 1mm y se introdujo de forma rápida el catéter.

Antes de fijar la cánula se comprobó su correcto funcionamiento aspirando un pequeño volumen de sangre con la jeringuilla conectada en el extremo exterior. Luego se fijó la cánula con varios

puntos de sutura en la capa muscular, se impregnó la herida con yodo y finalmente se cerró la herida. Una vez finalizada la operación, se cortó el catéter dejando al exterior unos 3 ó 4 cm y se cerró con un obturador para evitar pérdida de sangre. Finalmente, el animal se colocó en una jaula de doble fondo, con el fin de evitar la coprofagia y se dejó en recuperación, con libre acceso de agua durante más de 4 horas.

La selección de los animales para la administración intravenosa u oral fue aleatoria y el ensayo se realizó paralelamente. No se considera la posibilidad de realizar ensayos cruzados puesto que trabajos anteriores han demostrado que la implantación de la cánula cerca del ventrículo izquierdo altera, con el tiempo, las condiciones hemodinámicas del mismo e impide que cada individuo sea un buen patrón de sí mismo.

2.1.5.4 Análisis de las muestras.

Durante la validación de los modelos teóricos de predicción de propiedades físico-químicas y de absorción, mediante la determinación de la absorción intestinal de la Sarafloxacin y Esparfloxacin, se utilizó un procedimiento por HPLC para cuantificar la concentración de soluto en las muestras biológicas. El análisis fue desarrollado en columnas C18 Novopack (3.9 x 150 mm), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y buffer fosfato 1/15 M (20:80 v/v) ajustado a pH 2.4 con ácido ortofosfórico para la Sarafloxacin y una mezcla de acetonitrilo- buffer fosfato 10 mM (ajustado a pH 3.0) con 0.012% de heptano (23:77 v/v) para la Esparfloxacin. El equipamiento consistió en una bomba cuaternaria Serie 1050 Hewlett-Packard, un autoinyector Serie 1100 Hewlett-Packard y un integrador LCI-100 Perkin Elmer. La detección fue realizada por espectrofotometría a 291 nm para la Esparfloxacin y por fluorimetría para la Sarafloxacin, con longitud de onda de excitación y emisión de 285 y 442 nm, respectivamente. Ambos procedimientos fueron selectivos y específicos. La exactitud fue estimada del porcentaje de error asociado con la medición (tres veces) de 5-8 estándares. La exactitud fue mayor de un 85% en relación a la concentración de analito. La precisión (repetibilidad y reproducibilidad) fue calculada como el coeficiente de variación de 5 determinaciones sobre los mismos estándares y fue menor del 5%. La linealidad se estableció sobre el rango de concentraciones presentes en las muestras para cada compuesto, siempre sobre 0.999. Además se consideró el valor del intercepto, el intervalo de confianza del intercepto (que contenga al cero) y la desviación estándar relativa de la pendiente (< 2 %), como criterios de linealidad.

-6 Fluoroquinolonas

Para la validación de los modelos teóricos de predicción de propiedades farmacocinéticas y farmacológicas, mediante la determinación de la biodisponibilidad de la CNV 97102 y la CNV 97104, se utilizó un procedimiento por HPLC. El plasma se desproteinizó con 300 μ L de metanol al cual se le añadió el estándar interno (3, 4, 5-trimetoxibenzaldehído para el CNV 97102 y el N-hexilciprofloxacino para el CNV 97104), y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se cuantificó la concentración de quinolona en el sobrenadante. El equipamiento empleado fue el mismo que se mencionó anteriormente y se utilizó una columna Novopack como fase estacionaria, mientras la fase móvil se ajustó para cada compuesto de ensayo con el fin de obtener la mejor resolución cromatográfica. La fase móvil consistió en una mezcla metanol /acetonitrilo/buffer fosfato en proporciones volumétricas de 5/20/75 para el CNV 97102 y 5/30/65, para el CNV 97104. La excitación optimizada y la longitud de onda de emisión fueron de 285 y 442 nm, respectivamente. El procedimiento de validación se desarrolló de forma usual (Merino y col., 1995; Ruiz-García y col., 1999; Bermejo y col., 1999).

2.1.5.5 Análisis de Datos.

El análisis farmacocinético fue desarrollado para los datos experimentales individuales y medios de cada compuesto (CNV 97102 y CNV 97104). Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados a través del WinNonlin™ Professional 2.1 (1994). Como los resultados obtenidos fueron similares, solamente se reportaron los valores medios. La biodisponibilidad (F) se calculó como la razón del área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo, para la administración oral e intravenosa (AUC_{oral} y AUC_{iv}, respectivamente), y se normalizaron con los valores de dosis correspondientes. El AUC se calculó a través de la regla trapezoidal, hasta el último punto de la toma de muestra. El área total bajo la curva, AUC_0^∞ , se obtuvo adicionando el valor de C_p/k a $AUC_0^{t_0}$, donde la C_p es la última concentración experimental de fármaco, y k representa la constante de velocidad monoexponencial terminal para los niveles medios plasmáticos de los compuestos ensayados.

2.2 Resultados y Discusión.

2.2.1 Predicción de las propiedades físico-químicas y de absorción de 6-fluoroquinolonas.

Las estructuras moleculares de todas las 6-fluoroquinolonas, utilizadas en los estudios de predicción de las propiedades físico-químicas, de absorción y farmacocinéticas-farmacológicas, se aprecian en el Anexo 6.

■6 Fluoroquinolonas

El mejor modelo teórico obtenido para el coeficiente de partición n-octanol / buffer salino (Log P) se refleja a continuación:

$$\text{Log P} = 1.16 (\pm 0.30) - 4.50 (\pm 0.59) \mu_{1L-PR} + 1.81 (\pm 0.20) \mu_{2L-PR} + 1.14 (\pm 0.17) \mu_{3L-PR} - 0.50 (\pm 0.06) \mu_{4L-PR} - 1.42 \cdot 10^{-8} (\pm 1.1 \cdot 10^{-9}) \mu_{15H} \quad (10)$$

$$N = 25 \quad R = 0.979 \quad R^2 = 0.958 \quad S = 0.31 \quad S_{CV} = 0.45 \quad F_{exp}(5,19) = 88.75$$

donde, N es el número de compuestos utilizados, R es el coeficiente de regresión, S es la desviación estándar, S_{CV} es la desviación estándar de la validación cruzada y F_{exp} es la razón de Fisher experimental. Este modelo muestra que el Log P de los derivados 6-fluoroquinolónicos utilizados en el estudio, es dependiente del momento espectral local en el anillo piperazínico (anillo 1, ver Anexo 6) y de las potencialidades de las moléculas para ceder un átomo de hidrógeno (μ_{15H})

Los Log P, experimentales y calculados, de las 6-fluoroquinolonas utilizadas en el estudio de predicción de propiedades físico-químicas y de absorción aparecen en la Tabla 1 (primera y segunda columna de datos). También se determinaron los Log P, de cuatro derivados 6- fluoroquinolónicos cuyos resultados aparecen en la propia Tabla 1 (segunda columna de datos).

Los parámetros estadísticos de la predicción del Log P sugieren una buena calidad del modelo, y la baja desviación estándar de la validación cruzada (0.45) evidenció su adecuado poder predictivo. Los datos experimentales revelaron que la Enoxacina fue un "outlier". La sustitución heteroatómica en C_8 (C por N), produce una transformación en la estructura de la quinolona a naftiridona, incrementando la densidad electrónica alrededor de la posición 8 y la posibilidad de formación de enlaces por puentes de hidrógeno, con el consecuente cambio en las propiedades físico-químicas y de absorción. Los modelos ofrecen valores adecuados de Log P para los cuatro compuestos predichos.

La Sarafloxacina tiene una estructura química similar a la Norfloxacina y la Ciprofloxacina, lo cual hace pensar que los coeficientes de partición predichos sean lógicos. Además, si analizamos las sustituciones en N i para los tres compuestos, hay un incremento en el tamaño del sustituyente pero no existen variaciones en los momentos dipolares, por lo que las sustituciones en esta posición no afectarán los valores finales de Log P. En el caso de la Grepafloxacina y la Temafloxacina tienen cierta relación estructural con la CNV 97100, y sus mínimas diferencias en los sustituyentes ocurren en posiciones que prácticamente no son consideradas dentro de la información de las

variables del modelo, siendo los resultados consistentes con esto. Finalmente, la Fleroxacina tiene prácticamente la misma estructura química que la Lomefloxacina, sin embargo la diferencia en los valores de Log P predichos radica en la variación del momento dipolar del enlace C-F con relación al enlace C-C.

Tabla 1: Parámetros físico-químicos y farmacocinéticos (coeficiente de partición, constante de velocidad de absorción y permeabilidad intestinal) de los derivados de las 6-Fluoroquinolonas, determinados teórica y experimentalmente. Aplicación de la metodología topológica-subestructural TOPS-MODE.

Nombre	LogP _c ^a	Log P _p ⁱ	Res ^g	LogKa _a ^h	LogKa _p ^j	Res ^k	LogPeff _e ^l	LogPeff _p ^m	Res ⁿ
Norfloxacina	-1.52	-1.36	0.16	-0.38	-0.34	0.04	-4.98	-4.99	0.01
Pefloxacina	0.26	0.47	0.21	0.28	0.49	0.21	-4.32	-4.16	0.16
n-Etilnorfloxacina	0.37	0.24	-0.13	0.44	0.48	0.04	-4.16	-4.19	-0.03
n-Propilnorfloxacina	1.05	0.86	-0.19	0.61	0.61	0.00	-3.99	-4.06	-0.07
n-Butilnorfloxacina	1.48	1.48	0.00	0.75	0.63	0.12	-3.86	-4.02	-0.16
n-Pentilnorfloxacina	2.11	2.10	-0.01	0.76	0.73	-0.03	-3.85	-3.91	-0.06
n-Hexilnorfloxacina	2.71	2.73	0.02	0.78	0.81	0.03	-3.83	-3.81	0.02
n-Heptilnorfloxacina	3.22	3.35	0.13	0.78	0.86	0.08	-3.83	-3.75	0.08
Ciprofloxacina	1.10	-1.36	-0.26	0.20	-0.17	0.03	-4.81	-4.74	0.07
n-Metilciprofloxacina	0.15	0.47	0.32	0.41	0.44	0.03	-4.19	-4.12	0.07
Enrofloxacina	0.53	0.24	-0.29	0.55	0.54	0.01	-4.06	-4.05	0.01
n-Propilciprofloxacina	1.07	0.86	0.21	0.68	0.62	-0.06	-3.92	-3.96	-0.04
n-Butilciprofloxacina	1.55	1.48	-0.07	0.76	0.66	0.10	-3.85	-3.91	-0.06
n-Pentilciprofloxacina	2.06	2.10	0.04	0.78	0.71	-0.07	-3.82	-3.84	0.02
n-Hexilciprofloxacina	2.56	2.73	0.17	0.78	0.75	-0.03	-3.82	-3.79	0.03
n-Heptilciprofloxacina	3.02	2.90	0.12	0.78	0.88	0.10	-3.82	-3.74	0.08
CNV 97100	0.68	-0.38	0.30	0.09	0.03	-0.06	-4.51	-4.55	-0.04
CNV 8804	0.97	1.30	0.33	0.85	0.67	-0.18	-3.75	-3.77	0.02
CNV 8919	1.74	1.03	-0.71	0.88	0.98	0.10	-3.73	-3.55	0.18
Flumequina	0.97	0.98	0.01	0.84	0.83	0.01	-3.77	-3.75	0.02
Oxfloxacina	-0.47 ^p	-0.03	0.44		0.30			-4.40	
Enoxacina	-1.02 ^p	-2.77	-1.75		0.22			-4.44	
Esparfloxacina	-0.31 ^c	-0.72	-0.41	0.38 ⁱ	0.37			-4.29	
Sarafloxacina		-1.36		-0.31 ⁱ	-0.28			-5.11	
Lomefloxacina	-1.28 ^d	-0.87	0.41		-0.09			-4.74	
CNV 8706	-0.33 ^e	-0.18	0.15		0.08			-4.49	
CNV 9201	0.22 ^e	0.02	-0.24		0.31			-4.23	
Grepafloxacina		-0.38			0.15			-4.46	
Fleroxacina		-1.86			0.37			-4.30	
Temafloxacina		-0.38			0.29			-4.21	

^aCoefficiente de partición en octanol-buffer pH 7.0, tomado de las referencias (Bermejo y col., 1999); ^b(Zlotos y col., 1998); ^c(Ooie y col., 1996); ^d(Jaehde y col., 1992) y ^e(Escribano y col., 1997). ^fCoefficiente de partición predicho por Ec. (10). ^g Observado -calculado. ^h Constante de velocidad de absorción tomado de ref. (Bermejo y col., 1999). ⁱ Constante de velocidad de absorción determinada experimentalmente. ^j Constante de velocidad de absorción predicha por Ec. (11). ^k Observado -calculado. ^l Permeabilidad intestinal *In Situ* (Sánchez-Castaño y col., 2000). ^m Permeabilidad intestinal *In situ* predicha por Ec. (12). ⁿ Observado - calculado.

-6 Fluoroquinolonas

Entre los compuestos con mayores valores residuales aparecen aquellos donde el átomo de N del anillo piperazínico ha sido sustituido por un heteroátomo diferente (CNV 8919, CNV 8804); variando la densidad electrónica del anillo y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno. En el caso de la Otloxacina, el valor residual es alto ya que el puente oxi-metileno (-O-CH₂-) lo convierte en un heterólogo, diferenciándolo sustancialmente del resto de las estructuras. En el caso de la 4n-Metilciprofloxacina la contribución del primer metil al coeficiente de partición, cuando éste sustituye los átomos de hidrógeno, produce una variación entre los valores experimentales y predichos. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores (Bermejo y col., 1999). Al mismo tiempo el modelo teórico depende, en una forma negativa, de la capacidad de la molécula para liberar un protón hidrógeno, disminuyendo así el valor de Log P. Este resultado nos permite validar el uso de μ_{OL-PR} en los fenómenos de modelación mediados por enlaces de hidrógeno. El mejor modelo teórico para el Log Ka de las veinte 6-fluoroquinolonas evaluadas fue el siguiente:

$$\text{Log Ka} = 0.45 (\pm 0.08) + 0.39 (\pm 0.03) \text{Log P} - 0.15 (\pm 0.02) \mu_{OL-PR} + 3.20 \cdot 10^{-5} (\pm 0.6 \cdot 10^{-5}) \mu_{9L-PR} \quad (11)$$

$$N = 20 \quad R = 0.968 \quad R^2 = 0.934 \quad S = 0.10 \quad S_{CV} = 0.11 \quad F_{exp}(3,16) = 80.92$$

Los valores de Log Ka experimental y calculado para todos los derivados analizados aparecen en la Tabla 1 (cuarta y quinta columna de datos).

El modelo anterior, para la predicción de la constante de velocidad de absorción, mostró buenos resultados estadísticos. Como se puede observar, el Log Ka depende del Log P y de los momentos espectrales locales sobre el anillo piperazínico. Los mayores valores residuales corresponden a la Pefloxacina (0.21) y la CNV 8804 (-0.18), donde se aprecian efectos similares a los mencionados anteriormente para el caso del Log P.

La introducción secuencial de grupos metilenos en la posición R₄ del anillo piperazínico produce un incremento en la constante de velocidad de absorción, y la sustitución del átomo de hidrógeno en la cadena alifática por el grupo OH (CNV 8706) produce una disminución en el valor del Log Ka.

Para la predicción de los derivados 6-fluoroquinolónicos, la Sarafloxacina y la Lomefloxacina tienen las menores constantes de velocidad de absorción. Este resultado está influenciado por los bajos valores del Log P que presentan estos compuestos y por la contribución negativa de la variable μ_{OL-PR} la cual cuantifica el número de átomos en la posición R₄ del anillo piperazínico y

-6 Fluoroquinolonas

contiene implícita la variación en los momentos dipolo, fundamentalmente del enlace C-F. Finalmente, el modelo teórico sugiere que la absorción es una función que se incrementa con el aumento de la lipofilidad (Bermejo y col., 1999; Escribano y col., 1997).

El modelo teórico determinado para el coeficiente de permeabilidad aparente (Log Peff) fue el siguiente:

$$\text{Log Peff} = -3.90 (\pm 0.10) + 0.39 (\pm 0.02) \text{ Log P} - 0.13 (\pm 0.01) \mu_{\text{ol}} + 2.30 \cdot 10^{-3} (\pm 0.31 \cdot 10^{-3}) \mu_{\text{sl}} \quad (12)$$

$$N = 19 \quad R = 0.979 \quad R^2 = 0.959 \quad S = 0.08 \quad S_{\text{cv}} = 0.08 \quad F_{\text{exp}}(3,15) = 118.42$$

La permeabilidad intestinal *in situ* de las 6-fluoroquinolonas, así como sus constantes de velocidad de absorción están influenciadas de forma positiva por el coeficiente de partición, pero en el primer caso aparecen los momentos espectrales locales generales. Por esta razón un incremento en la lipofilidad facilita la difusión del compuesto a través de la membrana intestinal, lo cual coincide con lo señalado por otros autores (Sánchez-Castaño y col., 2000).

Por otro lado, los momentos espectrales locales generales (ver epígrafe 2.1.1) tienen una fuerte influencia sobre la permeabilidad intestinal. Como se aprecia en la Tabla 1, la permeabilidad aumenta con la lipofilidad hasta un valor límite, y entonces, dependiendo del tamaño de la cadena, el valor de Log Peff podría disminuir. En este modelo el compuesto CNV 8919 se detectó como “outlier”. Esto podría ser explicado por los cambios electrónicos que la sustitución tiomorfolínica introduce en esta molécula, lo cual probablemente modifica su interacción con la membrana absorbente. Para los derivados 6-fluoroquinolónicos, cuyos Log Peff fueron predichos por la ecuación 12, los resultados son consistentes con los obtenidos por el conjunto de datos experimentales.

Para estudiar las contribuciones de grupo a las propiedades físico-químicas y de absorción, así como los efectos estéricos y electrónicos de diferentes sustituyentes sobre el esqueleto quinolónico, se evaluaron 36 sustituyentes sobre el anillo piperazínico de la n-Metilciprofloxacina. El total de grupos estudiados y sus contribuciones normalizadas a ambas propiedades, se muestran en la Tabla 2.

El análisis de factores mostró que tres de ellos explicaron el 77.81% de la varianza total. Las comunalidades fueron entre 95.3% y 83.7 % para las propiedades seleccionadas, (ver las ecuaciones de la 13 a la 16). Además los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.984, lo cual significa que la calidad estadística fue buena. Estos factores pueden ser identificados como:

Factor Absorción-Lipofilia (F1, alta correlación con propiedades de absorción y Log P), Electrónico (F2, debido a la buena correlación con la constante de Hammet) y Estérico (F3, correlación con el parámetro STERIMOL, refractividad molar y constantes de Hansch).

Las principales ecuaciones que expresan la relación entre factores en las posiciones R4 y R5 del esqueleto 6-fluoroquinolónico son las siguientes:

$$\text{Log Ka}_4 = 0.868 F1 - 0.004 F2 + 0.328 F3 + 0.860 \quad (R= 0.995) \quad (13)$$

$$\text{Log Ka}_5 = 0.968 F1 + 0.105 F2 + 0.069 F3 + 0.953 \quad (R= 0.987) \quad (14)$$

$$\text{Log Peff}_4 = 0.877 F1 + 0.044 F2 + 0.373 F3 + 0.911 \quad (R= 0.994) \quad (15)$$

$$\text{Log Peff}_5 = 0.896 F1 + 0.183 F2 + 0.035 F3 + 0.837 \quad (R= 0.984) \quad (16)$$

El término independiente es la varianza específica para cada propiedad (comunalidad).

El análisis de factores demostró que la absorción está determinada por un factor absorción-lipofilia característico del esqueleto quinolónico (F1). Este resultado se corrobora por los altos coeficientes de F1 en las ecuaciones factoriales, lo cual está en armonía con el hecho de que casi todas las quinolonas comerciales tienen buena absorción (Bermejo y col., 1999; Sánchez-Castaño y col., 2000). El análisis factorial mostró que los efectos electrónicos y estéricos producen una ligera alteración en las propiedades de absorción, lo cual se evidencia por los bajos coeficientes (< 0.4) de F2 y F3 en las ecuaciones factoriales. Este resultado coincide con lo reportado por otros investigadores (Bermejo y col., 1999), quienes sugieren que la absorción se incrementa con la lipofilidad, pero está modulada por factores electrónicos.

La posición R4 es más susceptible a cambios estéricos (0.37 a 0.33-coeficientes en las ecuaciones factoriales) que electrónicos (0.044 a -0.004). Mientras que, la posición R5 es más sensible a cambios electrónicos (0.18 a 0.11) que estéricos (0.07 a -0.04). Estos resultados pudieran ser explicados por el hecho que en la posición R4 hay un grupo metileno entre el sustituyente y el anillo piperazínico el cual disminuye la influencia electrónica más que en la posición R5, donde el sustituyente está directamente unido al anillo.

Las constantes de velocidad de absorción determinadas experimentalmente "in vivo" para la Sarafloxacin y la Esparfloxacin se muestran en la Tabla 1 (cuarta columna de datos). Los valores obtenidos estuvieron muy cercanos a los valores predichos por el modelo teórico. El bajo Log P para la Sarafloxacin, determinado por la aproximación teórica (-1.36), implica un bajo Log Ka.

-6 Fluoroquinolonas

Tabla 2. Contribuciones normalizadas de grupo a las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas (coeficiente de partición, constante de velocidad de absorción y permeabilidad intestinal) en las posiciones y Rs del esqueleto de la n-Metilciprofloxacina, determinadas teóricamente. Aplicación de la metodología topológica-subestructural TOPS-MODE.

GRUPOS	Log P R4	Log Ka R4	Log i ^{eff} R4	Log P R5	Log Ka R5	Log Peff R5	π	MR	σ_M	σ_p	L
Br	-0.40	-0.19	-0.38	-0.90	-0.74	-0.75	0.32	0.27	0.63	0.25	0.43
Cl	-0.43	0.20	-0.40	-0.98	-0.82	-0.82	0.27	0.18	0.60	0.25	0.40
F	-0.41	-0.19	-0.38	-0.93	-0.77	-0.78	0.05	0.03	0.55	0.07	0.30
I	-0.35	-0.16	-0.34	-0.73	-0.57	-0.60	0.42	0.42	0.56	0.20	0.48
OH	-0.32	-0.17	-0.34	-0.43	-0.28	-0.35	-0.25	0.09	0.19	-0.41	0.31
SH	-0.31	-0.15	-0.32	-0.45	-0.29	-0.36	0.15	0.28	0.40	0.16	0.39
NHNH ₂	-0.26	-0.18	-0.35	-0.58	-0.57	-0.54	-0.33	0.25	-0.03	-0.60	0.38
OCH 2CH ₃	0.30	0.32	0.24	-0.27	-0.06	-0.23	0.14	0.38	0.16	-0.26	0.55
CH ₂ OCH ₃	0.13	0.13	0.03	-0.20	-0.10	0.20	-0.29	0.36	0.03	0.03	0.55
SCH ₂ CH ₃	0.22	0.26	0.17	-0.36	-0.15	-0.30	0.40	0.55	0.29	0.03	0.59
NHCH ₂ CH ₃	-0.14	-0.13	-0.27	-0.51	-0.50	-0.49	0.03	0.45	-0.39	-0.67	0.56
Ciclopropil	0.61	0.63	0.56	-0.16	0.09	-0.14	0.43	0.41	-0.11	-0.23	0.47
C ₃ H ₇ -11	0.28	0.25	0.15	-0.12	0.00	-0.14	0.58	0.45	-0.11	-0.14	0.57
OC ₃ H ₇	0.42	0.37	0.31	-0.20	-0.01	-0.19	0.32	0.51	0.16	-0.27	0.68
NHC ₃ H ₇	0.02	-0.09	0.22	-0.44	-0.46	-0.46	0.23	0.59	-0.39	-0.67	0.68
CHCHCOCH ₃	0.41	0.29	0.26	-0.20	-0.09	-0.21	0.02	0.64	0.34	-0.01	0.65
C ₄ H ₉	0.41	0.30	0.21	-0.04	0.04	-0.11	0.80	0.59	-0.13	-0.18	0.69
C ^{IV} ter	0.27	0.68	0.43	-0.60	0.01	-0.44	0.74	0.59	-0.16	0.22	0.46
OC ₄ H ₉	0.55	0.42	0.37	-0.12	0.03	-0.16	0.58	0.65	0.16	-0.35	0.79
NHC ₄ H ₉	0.10	-0.04	-0.15	-0.37	-0.42	-0.43	0.43	0.73	-0.55	-0.56	0.79
C ₅ H ₁₁	0.54	0.35	0.27	0.03	0.08	-0.07	1.00	0.73	-0.13	-0.18	0.80
C ₆ H ₅	0.18	0.03	0.10	-0.57	-0.53	-0.63	0.73	0.76	0.10	0.01	0.71
CH ₂ Br	0.00	0.08	0.02	-0.28	-0.13	-0.23	0.30	0.40	0.19	0.15	0.46
CH ₂ Cl	-0.01	0.07	-0.03	-0.29	-0.13	-0.23	0.06	0.32	0.18	0.13	0.44
CH ₂ I	0.02	0.09	0.02	0.01	0.08	0.05	0.56	0.57	0.16	0.12	0.49
CH=NOH	-0.27	-0.17	-0.30	-0.59	-0.45	-0.56	-0.14	0.31	0.35	0.11	0.55
CHi	0.02	0.15	0.02	-0.03	0.24	0.02	0.21	0.17	-0.11	-0.19	0.34
OCH ₃	-0.13	-0.03	-0.17	-0.52	-0.38	-0.45	-0.01	0.24	0.19	-0.30	0.45
CH ₂ CH ₂	0.20	0.28	0.17	-0.32	-0.12	-0.26	0.31	0.33	0.08	0.02	0.48
CH ₂ CH ₃	0.15	0.20	0.09	-0.19	-0.05	-0.18	0.38	0.31	-0.11	-0.16	0.46
OCeII?	0.27	0.05	-0.05	-0.29	-0.28	-0.38	0.78	0.83	0.40	-0.03	0.51
NHC ₆ H ₅	0.22	-0.06	-0.15	-0.29	-0.42	-0.43	0.51	0.90	-0.19	-0.44	0.51
Ciclohexil	0.41	0.15	0.06	-0.29	-0.37	-0.42	0.94	0.80	-0.24	-0.24	0.69
CH=N C ₆ H ₅	0.11	-0.10	0.21	-0.01	-0.03	-0.10	-0.11	0.99	0.56	0.46	0.96
CH ₂ C ₆ H ₅	0.44	0.15	0.09	-0.02	-0.07	-0.17	0.75	0.90	-0.13	-0.10	0.41
CH ₂ O C ₆ H ₅	0.53	0.20	0.15	0.03	-0.03	-0.14	0.62	0.97	0.05	0.04	0.92

Este resultado coincide con la relación absorción-lipofilia previamente establecida (Bermejo y col., 1999; Sánchez-Castaño y col., 2000). Además, el rango de biodisponibilidad de este fármaco (11- 34%) se corresponde con su baja velocidad de absorción. En el caso de la Esparfloxacina, la constante de velocidad de absorción se predice muy bien y no es consistente con la baja lipofilia

del compuesto. Para explicar este hecho sería necesario hacer otros estudios que determinen si el proceso de absorción es mediado o no por transportadores.

2.2.2 Predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de 6- fluoroquinolonas.

Las estructuras de las 6-fluoroquinolonas utilizadas en la predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas se muestran en el Anexo 6. La mejor función discriminante obtenida para los valores de biodisponibilidad (F) en humanos, en la serie de entrenamiento, es la siguiente:

$$F = -0.956 - 0.119 \mu_{1-DE} + 1.559 \cdot 10^{-10} \mu_{15-DE} + 7.916 \cdot 10^{-10} \mu_{15-pa-de} \quad (17)$$

El valor del parámetro X de Wilks para el modelo es de 0.268 y la razón de Fisher $F_{exp}(3,13) = 11.85$. No se detectaron "outliers" estadísticos en la serie de entrenamiento. En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de probabilidad de clasificación para los compuestos de la serie de entrenamiento y los 7 de la serie de predicción externa (primera y segunda columna de datos). Este modelo muestra que los valores de F utilizados en el estudio dependen principalmente de los momentos espectrales totales (μ_i) y locales para el área polar de las moléculas ($\mu_i - PA$).

El porcentaje de exactitud global del modelo fue de un 100 % para la serie de entrenamiento. Si tomamos en consideración el procedimiento de validación cruzada (*dejando un compuesto fuera*), el modelo mostró un 88.23 % de buena clasificación (15/17), evidenciando su poder predictivo.

Los parámetros estadísticos del modelo discriminante obtenido para la predicción de la biodisponibilidad de derivados de 6-fluoroquinolonas, sugiere una alta calidad. Casi todos los compuestos tuvieron una probabilidad de clasificación mayor del 80 %. Solamente la Enoxacina, a pesar de ser bien absorbido, tuvo una baja probabilidad de clasificación. Este compuesto tiene una estructura de naftiridona, incrementándose la densidad electrónica alrededor del átomo de N y la posibilidad de formación de enlaces por puentes de hidrógeno con la utilización de los electrones libres del nitrógeno. Este hecho hace a esta estructura diferente del resto de las 6-fluoroquinolonas analizadas, ofreciendo cierta similitud con un compuesto de moderada biodisponibilidad, lo que podría tener alguna influencia en la reducción de la probabilidad de clasificación.

-6 Fluoroquinolonas

Tabla 3. Valores experimentales y predichos de Biodisponibilidad (F) y de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI90) en derivados de 6-fluoroquinolonas. Aplicación de la metodología topológica-subestructural TOPS-MODE.

Nombre	Alta F ^a (%)	Moderada F ^a (%)	F _H exp ^b	F _H pred ^l	F _{exp} ^j	F _H pred ^m	MCI ₉₀ exp ⁿ	MCI ₉₀ pred [*]
Serie de Entrenamiento								
Ciprofloxacina		99.8	70	60	44.8	56.3	2	2.2
Clinafloxacin		99.7	80	66			0.06	0.35
Difloxacina	99.9		90	91			2	5.7
Enoxacina	52.7		90	93			16	11.1
Fleroxacina	98.0		96	93			8	3
Gatilloxacina	97.6		96^c	95			0.39	0.28
Grepafloxacin		98.5	70^d	69			0.39	0.53
Lomefloxacin	81.3		95	93			16	4
Moxifloxacin		81.7	86	87			0.25	0.22
Norfloxacin		82.4	40^e	48	33.4	47.3	16	27
Ofloxacin	99.9		90	93			2	1.3
Pefloxacin	99.3		95^e	93	79.5	83.44	8	23
Rufloxacin		97.7	50	53			16	6
Sitafoxacin		99.9	84^f	87			0.05	0.05
Sparfloxacina	99.9		92^d	94			0.5	0.6
Temafloxacin	99.5		92^g	91			1	0.8
Trovafloxacin		96.2	80	77			0.25	0.42
Serie de Predicción Externa								
Tosufloxacin	99.8		NA^h	91			0.39	0.35
Balofloxacin	97.7		NA	95	87.5^k	89.7	0.39	0.28
4n-Propilcipro	99.9		NA	94	92.8	93.9		1.14
4n-Propilnorflo	95.6		NA	93	93.6	94.5		14.18
CNV 97100		99.8	NA	64	72	77.9		1.78
CNV 97102	94.1		NA	94	97^l	100		1.37
CNV 97104	99.6		NA	95	83^l	89.2		0.83

^a Probabilidad de Clasificación por Ec. (17). ^b F, (Turnidge, 1999). ^c F, (Product Information, 2000). ^d F, (Pickerill y col., 2000). ^e F, (Sharma y col., 1994). ^f F, (O'Grady y col., 2001). ^g F, (Fitton, 1992). ^h NA. Datos no disponibles. ⁱ Valor de biodisponibilidad en humanos (F) predicho Ec. (18 y 19). ^j Biodisponibilidad in vivo en ratas, tomado de (Sánchez-Castaño y col., 2000). ^k Biodisponibilidad in vivo en ratas, tomado de Ref. (Ishigai y col., 1995). ^l Biodisponibilidad in vivo en ratas determinada experimentalmente. ^m Biodisponibilidad predicha en humanos por Ec. (20). ⁿ Mínima concentración inhibitoria contra *Streptococcus pneumoniae* (MCI₉₀), tomado de (Turnidge, 1999). ^o Mínima concentración inhibitoria contra *Streptococcus pneumoniae* (MCI₉₀), predicha por Ec. (21).

Los descriptores de la ecuación 17, contienen información acerca del tamaño (momento espectral total) y del área de los grupos polares (momento espectral local) de las moléculas. Los descriptores de mayor magnitud, para ambos tipos de momentos espectrales (μ_{15}), tienen una contribución positiva al valor de F, lo cual está en correspondencia con la influencia que el peso molecular y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, tienen sobre esta propiedad biofarmacéutica (Clark, 1999; Stenberg y col., 2000).

-6 Fluoroquinolonas

Sin embargo, se debe considerar que los fármacos con adecuados valores de F poseen valores de enlazamiento a hidrógenos, lipofilidad y tamaño, dentro de un rango estrecho (Stenberg y col., 2000) y por esta razón, compuestos con valores positivos extremos de estas propiedades podrían tener un efecto negativo sobre la biodisponibilidad. Estos resultados concuerdan con lo referido por otros autores (van de Waterbeemd y col., 1996).

Los 7 compuestos de la serie de predicción externa fueron adecuadamente predichos por el modelo. La CNV 97100 tiene una estructura similar a la Grepafloxacin, por lo que los valores de F en el mismo rango, son un resultado lógico. La introducción secuencial de grupos metílenos en la posición R₄ (ver Anexo 6) del anillo piperazínico (CNV 97102, CNV 97104) produjo un incremento en la lipofilidad de las moléculas así como en la constante de velocidad de absorción, incrementando la permeabilidad de membrana y con esto el valor de biodisponibilidad.

La similitud estructural entre la Tosufloxacin y la Trovafloxacin sugieren una similitud en sus valores de F, sin embargo la primera se predice como de alta absorción y la segunda como moderada. Estos resultados están relacionados con el número de átomos en el anillo 1 que influyen directamente en la magnitud de la variable μ_{1-DE} y esto hace que la Trovafloxacin, con un átomo de carbono más, tenga una menor F. Para el caso de la Balofloxacin el valor de F predicho es similar al de la Gatifloxacin, con la cual tiene cierta relación estructural. Aunque la primera tiene una contribución negativa de la variable μ_{1-DE} , la contribución positiva de las otras dos variables también es mayor (mayor número de átomos). Finalmente, la 4n-Propilciprofloxacin y la 4n- Propilnorfloxacin tienen el mismo efecto alifático sobre la posición R₄, sólo que el sustituyente ciclopropilo en la posición R₁ del esqueleto 6-fluoroquinolónico produce valores mayores de F que el grupo etilo en la misma posición, según se muestra en la Tabla 3.

Debido a la imposibilidad de obtener modelos de regresión lineal multivariada (con adecuados valores estadísticos) para el parámetro F, principalmente cuando estructuras diferentes están presentes en los datos experimentales seleccionados (Escribano y col., 1997), se desarrolló un modelo teórico de regresión lineal Piecewise para los fármacos con valores altos y moderados de F. La viabilidad del modelo se justifica por el hecho de que principalmente los fármacos con altos valores de F, son de interés para la administración oral y por lo tanto, si un fármaco se clasifica como de moderada F, el amplio rango de valores para esta propiedad biofarmacéutica en el grupo

-6 Fluoroquinolonas

de clasificación (entre 90 y 30), tendrán una alta variabilidad. Ello haría necesario obtener valores cuantitativos.

El mejor modelo teórico obtenido para F se da a continuación:

$$\text{Log } F_M = 1.275 + 4.346 \cdot 10^{-7} \mu_{8-DE} + 3.840 \cdot 10^{-10} \mu_{NPA} \quad (18)$$

$$\text{Log } F_A = 1.963 + 5.858 \cdot 10^{-8} \mu_{8-DE} - 2.320 \cdot 10^{-10} \mu_{NPA} \quad (19)$$

$$N = 17 \quad R = 0.926 \quad R^2 = 0.858$$

El modelo para Log F depende de los momentos espectrales totales (μ_{8-DE}) y locales sobre la parte no polar de las moléculas (H_{2-NPA}). Según la ecuación 19, un ligero incremento del área no polar, su contribución negativa hace que disminuya el valor de F. Este es un resultado lógico, el cual concuerda con lo reportado por otros autores (Clark, 1999), donde debe existir un balance entre las áreas polares y no polares para obtener un adecuado perfil de absorción.

Los valores de F obtenidos por las ecuaciones 18 y 19 para los compuestos con F moderada y alta se muestran en la Tabla 3 (cuarta columna de datos). Como se puede observar, 7 compuestos fueron utilizados como serie de predicción externa.

Para los fármacos en fase de estudios preclínicos no es posible obtener valores experimentales de F en humanos. En este sentido, se llevó a cabo una correlación entre los valores de F en humanos, predichos “*in silico*”, y los valores experimentales “*in vivo*” en ratas para seis 6-fluoroquinolonas, permitiendo utilizar el modelo teórico como herramienta predictiva de F en humanos y al mismo tiempo como validación del procedimiento (Sánchez-Castaño y col., 2000; Ishigai y col., 1995). Solamente 2 fármacos (CNV 97102 y CNV 97104) fueron utilizados para corroborar los resultados finales. Este procedimiento nos permitió una segunda validación de los resultados obtenidos. La ecuación de correlación fue la siguiente:

$$F_{H-pred} = 21.192 + 0.783 \cdot F_{R-exp} \quad (20)$$

$$N = 6 \quad R = 0.980 \quad R^2 = 0.962 \quad F_{exp}(1,4) = 101.71 \quad p < 0.0005 \quad SE = 4.54$$

Los resultados predichos están contemplados en la Tabla 3 (sexta columna de datos).

Estas observaciones son válidas si se considera la similitud existente entre los procesos de absorción intestinal en ratas y en humanos por lo que los valores en ratas son usados como sustitutos de los valores en humanos (Lennernas, 1997; Stewart y col., 1995; Molina y col., 1992; Karali, 1995).

-6 Fluoroquinolonas

La ecuación 20 se utilizó para predecir los valores de biodisponibilidad en humanos de 2 nuevas 6-fluoroquinolonas, pero para lograr este propósito se realizó la determinación experimental de F en ratas. Los resultados alcanzados revelan la fuerte relación con los valores de F obtenidos por ambos métodos (cuarta y quinta columna de datos. Tabla 3).

Una de las posibilidades más interesantes que brinda la aproximación TOPS-MODE al diseño molecular es la posibilidad de obtener contribuciones cuantitativas de cualquier subestructura a la propiedad estudiada. El número de fragmentos estructurales que pueden ser evaluados para determinar sus contribuciones a las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas es, por supuesto, muy grande.

Para establecer una relación farmacocinética-farmacológica bajo una base estructural, así como para diseñar nuevos compuestos, se desarrolló un modelo de regresión lineal para la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI₉₀) contra *Sírepiococcus pneumoniae*.

El mejor modelo teórico obtenido para la MCI₉₀ fue el siguiente:

$$\text{Log (1/MIC}_{90}\text{)}_{sp} = -10.35 - 3.98 \cdot 10 \mu_{15,RI} + 5.43 \cdot 10^{-8} \mu_{14-R3} + 2.69 \cdot 10^{-6} \mu_{8-DE} \quad (21)$$

$$N = 19; \quad R = 0.915; \quad R^2 = 0.837; \quad S = 0.363; \quad S_{CV} = 0.379; \quad F_{exp}(3,15) = 25.85$$

donde, N es el número de compuestos utilizados, R es el coeficiente de regresión, S es la desviación estándar de la regresión, R² es el coeficiente de determinación, Scv es la desviación estándar de la validación cruzada y F_{exp} es la razón de Fisher experimental con un nivel de significación de 95%.

Este modelo muestra que los valores de MCI₉₀ de los derivados 6-fluoroquinolónicos utilizados en el estudio, son dependientes de los momentos espectrales locales en el anillo 1 (contribución negativa) y 3 (contribución positiva), y también de los momentos espectrales totales ponderados con la diferencia de electronegatividad entre los átomos que forman un enlace. Los valores experimentales y predichos de MCI₉₀ se muestran en la Tabla 3 (séptima y octava columna de datos).

Tomando en consideración la ecuación 17 (farmacocinética) y la ecuación 21 (farmacológica), así como la buenas propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de la Sitafloxacina, este compuesto fue seleccionado para analizar la influencia de 13 sustituyentes en las posiciones X e Y de su esqueleto, según se muestra en el Anexo 7.

Los resultados de la evaluación de los sustituyentes por las ecuaciones 17 y 21 se muestran en la tabla 4. Los mejores resultados para ambas propiedades (bajos valores de MIC₉₀ y altas contribuciones a la F), se obtuvieron cuando los sustituyentes sobre el anillo 3 (ver Anexo 7) fueron los halógenos y el grupo metoxi.

Tabla 4. Contribuciones de diferentes sustituyentes a las propiedades de Biodisponibilidad (F) y de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI₉₀) en las posiciones X e Y de la Sitafloxacin. Aplicación de la metodología topológica-subestructural TOPS-MODE.

Sustituyente	MCI ₉₀		F	
	X	Y	X	Y
F	0.046	1.656	0	-0.353
Cl	0.048	2.376	0.505	0.096
Br	0.065	1.976	0.544	0.146
1	0.114	1.330	0.587	0.204
OH	0.236	0.420	-0.709	-1.268
NH₂	0.302	0.325	-0.731	-1.265
CH₃	0.381	0.211	0.207	-0.213
OCH ₃	0.112	0.513	0.338	-0.114
CH₂F	0.217	0.252	0.123	-0.301
CH₂Cl	0.249	0.296	0.206	-0.214
CH₂Br	0.260	0.298	0.207	-0.213
CH₂I	0.278	0.296	0.202	-0.217
CH.OH	0.257	0.234	-0.165	-0.592

Como ha sido ampliamente discutido por otros autores (Domagala, 1994; Domagala y col., 1991), los halógenos (F y Cl) y el grupo metoxi en la posición 8 del fragmento fluoroquinolónico, incrementan la absorción oral y la actividad contra bacterias Gram-positivas. También los grupos ciclopropilo y amino-pirrolidínico en las posiciones N1 y C7, respectivamente del esqueleto 6- fluoroquinolónico, mejoran la efectividad antimicrobiana.

En el caso de la Sitafloxacin, hay un grupo ciclopropilo en la posición N1 y un grupo ciclopropilo en la posición 4 (espiro) del resto 3-aminoazolidina de la posición C7 del esqueleto fluoroquinolónico. Tomando en consideración ambos grupos, cualquier sustituyente en la posición X (ver Anexo 7) tendría una mejor movilidad e interacción con el blanco biológico debido a la libre rotación del grupo ciclopropilo alrededor del enlace Ci-Nj.

Los halógenos y el grupo metoxi en la posición X, como grupos voluminosos, incrementarán la lipofilidad y las propiedades de absorción, y disminuirán los valores de MCI₉₀. Por el contrario, los grupos polares como el OH y NH₂ reducirán la contribución a la biodisponibilidad debido a la

posibilidad de formar enlaces por puentes de hidrógeno y disminuyen la actividad por incremento del valor de MCI_{90} .

2.3 Conclusiones Parciales

- 1- Los modelos teóricos desarrollados para predecir las propiedades físico-químicas y de absorción de las 6-fluoroquinolonas están muy relacionados con los momentos espectrales locales, fundamentalmente la información estructural del anillo piperazínico, y de los átomos de hidrógenos unidos a heteroátomos.
- 2- Las constantes de velocidad de absorción y el coeficiente de permeabilidad aparente de las 6-fluoroquinolonas están estrechamente relacionados con la lipofilia de las moléculas, especialmente su coeficiente de partición.
- 3- La absorción está determinada por un factor absorción-lipofilia, característico del esqueleto quinolónico, aunque los efectos electrónicos y estéricos de los sustituyentes producen ligeras alteraciones en las propiedades de absorción.
- 4- Los modelos teóricos desarrollados para predecir las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de las 6-fluoroquinolonas están relacionadas con los momentos espectrales locales y totales, conteniendo información de las áreas de los grupos polares y del tamaño molecular, respectivamente.
- 5- La interrelación entre los modelos farmacocinéticos y farmacológicos es una buena herramienta para el diseño de nuevos derivados 6-fluoroquinolónicos con perfiles cinéticos y farmacológicos mejorados.

CAPÍTULO III
CAPÍTULO III

***ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y DE
ABSORCIÓN DE 2-NITROVINILFURANOS***



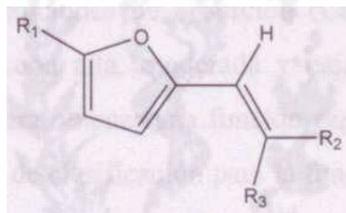
CAPITULO III. ESTUDIOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y DE ABSORCIÓN DE 2-NITROVINILFURANOS.

3.1 Materiales y Métodos.

3.1.1 Aproximación TOPS-MODE.

El estudio teórico de predicción de propiedades físico-químicas de 2-nitrovinilfuranos se desarrolló utilizando la aproximación TOPS-MODE, descrita en el acápite 2.1.1. La determinación de los 15 primeros momentos espectrales de la matriz de adyacencia de enlaces con hidrógenos suprimidos, se desarrolló utilizando los momentos dipolos de enlace (Potapov, 1978). Se calcularon los momentos espectrales totales y el descriptor HB1, el cual indica el número de posibles enlaces de hidrógenos que una molécula puede formar como aceptor o donador (Yang y col., 1986).

Las contribuciones de grupos a las propiedades físico-químicas (Log P y pKa) se analizaron en las posiciones R₁ y R₃ del esqueleto furánico, como se observa en la siguiente figura:



Además, se realizó un Análisis de Factores entre las contribuciones de grupo y las constantes de Hammet y Hansch con las propiedades físico-químicas, de la misma forma que la descrita en el acápite 2.1.2.2.

Para el estudio teórico de predicción de propiedades de absorción de 2-nitrovinilfuranos se utilizó una base de datos de compuestos con amplia diversidad estructural y con valores de absorción en humanos previamente reportados (Wessel y col., 1998; Palm y col., 1997; Kansy y col., 1998; Benet y col., 1996; Bertz y Granneman, 1997). Esta selección se debió principalmente a la inexistencia de datos de absorción para compuestos pertenecientes a esta familia.

Tomando en consideración el paradigma de las correlaciones estructura-permeabilidad utilizado para evaluar la absorción oral, el cual fue descrito por van de Waterbeemd y col. (1996), se decidió emplear varias ponderaciones para diferenciar los enlaces moleculares como son:

hidrofobicidad, superficie polar, masa atómica y las interacciones de estas con el número de átomos de las moléculas (sin contar los hidrógenos).

Por otro lado, se evaluó la contribución de fragmentos a la propiedad en estudio, seleccionando inicialmente, todas las subestructuras a las cuales se les iba a determinar su contribución (Estrada y col., 1998; Estrada, 1996, 1997; Estrada y Peña, 2000a; Estrada y col., 2000a; Estrada y Uriarte, 2001a; Estrada y col., 2001a). Luego, se calcularon todos los fragmentos contenidos en la subestructura correspondiente y la contribución de la subestructura a los momentos espectrales se obtiene como la diferencia entre los momentos espectrales de la subestructura y todos sus fragmentos. Finalmente, se sustituyó la contribución de los fragmentos en el modelo cuantitativo desarrollado para describir la propiedad.

Los momentos espectrales fueron calculados con el programa Modeslab 1.0b (Gutiérrez y Estrada, 2002) y se utilizaron como descriptores moleculares, para encontrar un modelo cuantitativo, en un Análisis Discriminante Lineal (ADL) (ver acápite 2.1.2.3). Tomando en consideración la alta variabilidad individual en las mediciones de absorción (Caldwell, 2000), este procedimiento permitió clasificar las moléculas con alta, moderada y baja absorción intestinal en humanos (AIH), como un primer escalón para obtener una función capaz de predecir esta propiedad para grandes bases de datos. El criterio de clasificación para la función discriminante fue seleccionado de acuerdo a lo planteado por otros autores, de la siguiente forma: los compuestos con valores de biodisponibilidad oral $\geq 90\%$, lo cual implícitamente requiere de una absorción intestinal de al menos un 90% , tendrán una alta absorción y los compuestos con valores de biodisponibilidad menores que 30% tendrán una baja absorción (Caldwell, 2000; Egan y Lauri, 2002).

La serie de entrenamiento (89 compuestos) se dividió en dos subgrupos en relación con el modelo discriminante desarrollado. El primer modelo se desarrolló para diferenciar los fármacos de pobre absorción (AIH $< 30\%$) del grupo de moderada-alta absorción (AIH $\geq 30\%$); el segundo, fue para discriminar los compuestos con alta AIH ($> 90\%$) del resto de los fármacos. Esta estrategia se relaciona con el hecho de que casi todos los modelos reportados de predicción de la absorción intestinal (rápido cómputo) han sido desarrollados, principalmente, para clasificar compuestos con pobre absorción. Algunos de estos métodos son: la Regla de los 5 (Lipinski y col., 1997) y los valores de áreas superficiales polares, PSA (Clark, 1999), entre otros.

-2 Nitrovinilfuranos

Dieciocho compuestos tomados de la literatura (Palm y col., 1997; Kansy y col., 1998; Benet y col., 1996) conformaron el grupo de predicción externa y no fueron utilizados en el desarrollo de la función discriminante; ellos fueron reservados para validar los modelos encontrados.

La calidad estadística de los modelos se determinó según acápite 2.1.2.3. Los compuestos se consideraron no clasificados por el modelo (U) cuando las diferencias en el porcentaje de clasificación entre dos grupos no fueron superiores al 5%. Sin embargo, se utilizaron las probabilidades posteriores para clasificar los compuestos de acuerdo a los valores de AIH.

Una vez obtenido el primer modelo discriminante, solamente los fármacos con valores de AIH menor que 30% pueden ser clasificados y diferenciados de aquellos compuestos con valores moderados y altos de AIH. Por este motivo, se desarrolló un segundo análisis discriminante para separar los fármacos con alta AIH del resto de los compuestos. El criterio de clasificación fue el siguiente: compuestos con $AIH > 90$ (alta absorción) y $AIH < 90$ (moderada-baja absorción). Se utilizó la misma serie de entrenamiento y predicción que en el modelo anterior.

Una vez obtenidos ambos modelos discriminantes, se llevó a cabo una validación externa posterior. Se evaluaron 174 compuestos con valores de biodisponibilidad reportados (Benet y col., 1996; Bertz y Granneman, 1997). El criterio de selección fue el siguiente: para evaluar el primer modelo discriminante se seleccionaron todos los fármacos con valores de F mayor que 30% ya que los valores de AIH deben ser iguales o mayores a los valores de F seleccionados. Para el segundo, la selección tomó en consideración que los fármacos tuvieran valores de F mayores que 80%, ya que al menos los valores de AIH estarían entre un 85 y un 90% (considerando una pérdida hipotética de entre un 5-10% por efecto de primer paso hepático); y estando de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), en el caso de fármacos con alta permeabilidad ($> 90\%$), se propone un 80% como un valor más real (Kanfer, 2002). Cuando dos o más valores para un fármaco eran disponibles o los valores estaban dentro de un rango, se empleó el valor medio. En este estudio, 56 fragmentos pertenecientes a compuestos con alta, moderada y pobre absorción fueron seleccionados y calculadas sus contribuciones al valor de AIH. Aunque el fragmento estructural aislado no presupone el obtener un valor alto, moderado o bajo de AIH, ya que es bien conocido que la propiedad evaluada es consecuencia de la suma de las contribuciones de todos los

■2 Nitrovinilfuranos

fragmentos en la molécula, sería posible diseñar un fármaco hipotético con buenas propiedades de absorción considerando aquellos fragmentos con alta contribución al valor de AIH.

Finalmente, se realizó una predicción teórica de la AIH para una serie de compuestos de la familia de los 2-nitrovinilfuranos, dentro de los cuales se destaca el G1, como un bactericida-fungicida de amplio espectro (Blondeau y col., 1999; Castañedo y col. 1994, Castañedo y Gaitán, 2000), y sobre el cual se desarrolló una caracterización experimental completa de su absorción intestinal.

3.1.2 Datos experimentales utilizados en los estudios de predicción de propiedades físico-químicas y de absorción de 2-nitrovinilfuranos.

Para el estudio de las propiedades físico-químicas se emplearon 30 derivados 2-nitrovinilfuránicos con valores de Log P reportados (Balaz y col., 1988).

Por otro lado, 31 fármacos fueron utilizados para obtener el modelo predictivo de la constante de disociación (pKa).

Los datos de absorción intestinal en humanos fueron seleccionados cuidadosamente de la literatura (Wessel y col., 1998; Palm y col., 1997; Kansy y col., 1998; Benet y col., 1996; Bertz y Granneman. 1997), por lo que se incluyeron en la serie de entrenamiento y de predicción solamente los compuestos que son predominantemente absorbidos por difusión pasiva. De los 86 compuestos tomados del Wessel y col. (1998), solamente 79 fueron usados en el modelo, debido a que el Metotrexato se absorbe por un proceso mediado por transportadores; la Zidovudina por transporte activo; la Amoxicilina, Cafetrizina y Lisinopril son absorbidos por un sistema transportador de dipéptidos; la Cefuroxima acetil, por un mecanismo de transporte especializado que obedece al proceso de Michaelis-Menten y en el caso del Etoposido, se piensa que su distribución a cerebro es parcialmente controlada por un proceso de transporte activo (Clark, 1999). Otros fármacos con baja absorción intestinal fueron incluidos en la serie de datos para incrementar el porcentaje de fármacos con pobre AIH. Finalmente, 107 compuestos conformaron el grupo total de datos.

3.1.3 Modelos "in vitro" "in situ" para la predicción de la absorción intestinal.

3.1.3.1 Modelos "in vitro"

3.1.3.1.1 Determinación del coeficiente de partición.

La lipofilidad de los derivados 2-nitrovinilfuranos como son, el 2-(2-nitro-vinil)-furano (G0); el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano (G1); el 2-bromo-5-(2-metil-2-nitro-vinil)-furano (UC-

245) y el 2-(2-metil-2-nitro-vinil)-furan (UC-244) se caracterizó por el coeficiente de partición n- octanol / buffer Ringer Krebs (pH=7.4). Para la determinación de este parámetro se utilizó un frasco de vidrio cubierto con papel de aluminio para proteger, de la luz, a los compuestos estudiados y se siguió el procedimiento de “frasco agitado” (OECD, 1981).

Los fármacos fueron disueltos en la solución buffer y agitados durante 20 minutos en un baño ultrasónico (Sonorex RK-52) para obtener soluciones sobresaturadas. Tres mililitros de esta solución filtrada se mezclaron con igual volumen de n-octanol (Merck, grado analítico) en un tubo de vidrio, para su posterior medición. El experimento de partición se desarrolló a 37 °C con condiciones efectivas de agitación. Las muestras fueron extraídas de la fase acuosa a intervalos de tiempo de 30 minutos para la determinación de la concentración de soluto. Finalmente, la concentración de cada compuesto fue determinada por HPLC.

El coeficiente de partición se calculó como la relación entre la concentración de fármaco en n- octanol (calculado por diferencia) y la concentración en la fase acuosa. Se utilizaron 6 valores por compuesto para obtener el valor promedio de este parámetro.

3.1.3.1.1 Método analítico para la cuantificación de los derivados 2-nitrovinilfuránicos.

Los compuestos en las muestras estudiadas fueron analizados por HPLC en fase reversa. El sistema consistió de una bomba gradiente (K-1000, Knauer), un detector de X variable (K-2150, Knauer) y un inyector Rheodyne. La columna analítica fue LiChrospher-100 RP-18 (250 x 2 mm) y la precolumna, LiChrospher-100 RP-18 (10 x 2 mm), ambas con un tamaño de partícula de 5 µm.

La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo (Merck, grado gradiente) y agua en proporción (80:20), respectivamente. La velocidad de flujo fue de 0.25 mL/min y el volumen de inyección, 10 µL. La longitud de onda se estableció a 366 nm para todos los compuestos. Estas condiciones experimentales resultaron en tiempos de retención que variaron entre 3-6 minutos. La cuantificación fue por el método de estándar externo. Este procedimiento ha sido previamente validado (Jiménez y Rodríguez, 1999).

3.1.3.1.2 Determinación de la absorción intestinal de GI.

La dispersión sólida de GI al 30 % en PEG 6000 (Fluka, Suiza), se preparó según el método de fusión (Castañedo y col., 1996). Con vistas a la cuantificación del GI en las muestras intestinales, se desarrolló una técnica espectrofotométrica UV-VIS. Para ello se realizó una curva de

■2 Nitrovinilfuranos

calibración (n = 4) del principio activo en n-hexano (BDH) en el rango de 0.05-0.9 µg/mL y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (UltraSpec III, Pharmacia, LKB, Suecia) a 360 nm.

Animales

En todos los ensayos “*in vitro*” se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho con un peso entre 350 y 370 g. Las ratas se adaptaron durante una semana a las condiciones del laboratorio, a temperaturas de 22 ± 2 °C y una humedad de 75 ± 5 %. Para la alimentación se utilizó pienso estándar para ratas suministrado por el CENPALAB. Durante este período, los animales tuvieron acceso al agua y comida “*ad libitum*”. La alimentación fue retirada 18 horas antes de comenzar los ensayos.

3.1.3.1.2.1 Optimización de la técnica espectrofotométrica.

Para el establecimiento de la técnica analítica se desarrolló un diseño experimental 2^2 considerándose dos factores fundamentales, tiempo de agitación (Ta) y de centrifugación (Te) en el intervalo de 2 a 5 minutos. Todos los factores se estudiaron a dos niveles (etiquetados con los signos - y +) y se realizaron tres réplicas para obtener la estimación de los efectos simples y de la interacción doble.

Los experimentos para la optimización de la técnica analítica se realizaron en tres ratas utilizando el método del saco intestinal (Wilson y Wiseman, 1954). Los animales fueron anestesiados con éter dietílico (AnalaR, BDH) y posteriormente se le realizó una incisión abdominal. El duodeno fue identificado, aislado, lavado con solución Ringer Krebs (pH=7.4) y eliminado rápidamente. Se dividió en tres partes que se mantuvieron inmersas en la solución reguladora. Las fracciones fueron evertidas con la ayuda de un aplicador. Uno de los extremos de la fracción de duodeno fue atado con hilo de seda para formar un saco. Se introdujeron 0,5 mL de solución Ringer en los sacos evertidos y se cerraron. Los sacos llenos fueron inmersos en recipientes de prueba con 30 mL de una solución de dispersión (120 µg/mL en solución Ringer oxigenada, 5% de CO₂-95% O₂). El recipiente se colocó en un baño de agua a 37 ± 1 °C. A los 30 minutos toda la solución se colectó del interior de los sacos. A las soluciones serosales se le añadieron 0,5 mL de n-hexano, se agitaron automáticamente a una velocidad de 180 oscilaciones por minuto y se centrifugaron a 3000 r.p.m. (tiempos seleccionados según diseño). Los sacos se lavaron y se realizó nuevamente

la extracción. Ambos sobrenadantes se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 360 nm. El blanco empleado fue una solución de n-hexano.

Los resultados obtenidos para los dos factores estudiados (T_a y T_e) se analizaron mediante un ANOVA. Se realizó un análisis de contrastes mediante el establecimiento de los intervalos LSD (Menor Diferencia Significativa) a través del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 4.1 para Windows (1999); y un análisis de residuos y de efectos sobre la dispersión, utilizando los modelos propuestos por Harvey (Harvey, 1976). Con los tiempos de agitación y centrifugación óptimos, se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica.

3.1.3.1.2.2 Determinación del GI en segmentos intestinales

Se prepararon sacos evertidos de estómago, duodeno (seguido del píloro), yeyuno (5 cm después del ligamento de Treitz) e íleon (cerca del orificio cecal) de cuatro ratas según la técnica descrita en el acápite anterior. La solución serosal fue de 0.5 mL del regulador salino a pH 7.4, para los tres segmentos intestinales y 1.5 mL, para el estómago. Las muestras en el sitio serosal se colectaron cada 15 minutos durante una hora. El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) para el GI en las diferentes condiciones experimentales, fue calculado según la ecuación siguiente (Sasaki y col., 1995):

$$P_{app} = (dC/dt) \cdot V / (C_o - A) \quad (22)$$

donde, dC/dt es el cambio en concentración por unidad de tiempo ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{s}$), V es el volumen del fluido serosal (mL), C_o es la concentración inicial de fármaco en el sitio mucosal ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y A es el área superficial de la membrana intestinal (cm^2).

Para esclarecer el mecanismo de transporte del GI, se estudiaron las diferencias direccionales de la velocidad de transferencia en segmentos duodenales del intestino de ratas ($n=3$). Una vez extraído el duodeno se dividió en tres fracciones, dos segmentos evertidos y uno normal. Uno de los sacos evertidos y el normal se colocaron en una solución salina con la dispersión sólida de GI (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la concentración serosal y mucosal (interior del saco), respectivamente. El otro saco evertido se colocó por 10 minutos en una solución de 10 mmol de Cianuro de Potasio (KCN), para envenenar los transportadores y evaluar la posible existencia de transporte activo (Ritschel y col., 1991). Luego se prosiguió con el mismo procedimiento de eversión y se calculó el P_{app} para las diferentes condiciones experimentales, corrigiendo los datos de concentración de GI sobre la base del factor de recuperación.

El análisis estadístico de los datos se realizó por la t de Student a través del programa SPSS 8.0 para Windows (1997) y se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

3.1.3.2 Modelos “*in situ*”.

La técnica de intestino “*in situ*” de rata fue desarrollada por el método de Doluisio modificado (Plá-Delfina y Moreno, 1981; Martín-Villodre y col., 1986), utilizando el intestino delgado completo de 6 ratas Wistar macho con un peso entre 210-295 g. Para evitar el reciclaje entero- hepático el conducto biliar fue canulado antes de la perfusión. Una solución salina isotónica fue preparada y ajustada a pH 7.00 adicionando 10 % (v/v) de una solución 0.066M de buffer fosfato Sorensen. Esta concentración evita los efectos de disrupción que sobre la membrana tienen los fosfatos (Murishita y col., 1973). La solución de ensayo, conteniendo GI, fue preparada inmediatamente antes de su uso, disolviendo la cantidad exacta del compuesto en la solución vehículo (w/v), dependiendo de su solubilidad. La concentración final de la solución de GI fue 600 ($\mu\text{g/mL}$). Después de disolver el compuesto, el pH de la solución fue controlado y reajustado, en caso necesario. Muestras del perfusato fueron colectadas en tubos de vidrio silanizados a tiempos prefijados, después de 5 minutos a intervalos de 5 minutos por 30 minutos. Todas ellas fueron analizadas inmediatamente.

Los estudios de reabsorción de agua se realizaron de la forma descrita en el acápite 2.1.5.2.1.

Constante de absorción intestinal “*in situ*”

La constante de absorción intestinal K_a del GI fue determinada por un análisis de regresión no lineal de la concentración remanente A_t vs t , utilizando el programa estadístico Sigma Plot 2.0 (Jandel Scientific). Para evitar la adsorción sobre la mucosa intestinal y el efecto de dilución sobre la muestra residual (Martín-Villodre y col., 1986; Doluisio y col., 1970), solamente se utilizaron para la regresión los valores calculados después de 5 minutos, encontrándose que después de este tiempo el equilibrio de adsorción fue alcanzado (Martín-Villodre y col., 1986).

Análisis de las muestras

Un procedimiento por HPLC, previamente validado (Jiménez y Rodríguez, 1999), se utilizó para cuantificar la concentración de soluto en las muestras biológicas. El análisis se desarrolló en una columna RP-18 (250 x 2 mm), utilizando como fase móvil una mezcla acetonitrilo/agua (80:20 v/v). El equipamiento consistió en una bomba cuaternaria Serie 1050 Hewlett-Packard, un

autoinyector Serie 1100 Hewlett-Packard y un integrador Perkin Elmer LCI-100. La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV-VIS a 360 nm.

3.1.3.3 Estudios farmacocinéticos y de biodistribución del ¹⁴C-G1.

3.1.3.3.1 Formulación para la administración oral del ¹⁴C-G1.

Se preparó una solución madre de ¹⁴C-G1 (Dalton Chemical Laboratories Inc., Ontario, Canadá, pureza mayor del 95% y actividad específica de 2.3 mCi/mmol) en Miglyol® 810 N (Hüls America Inc.), para ello se pesaron 45 mg del producto marcado y se añadieron en 500 µL del aceite.

La solución a administrar se preparó tomando una pequeña cantidad de la solución madre y se añadió a una solución de G1 en Miglyol® 810 N (24mg/mL) para obtener una concentración final de radioactividad de aproximadamente 8µCi/mL por rata (Francis y James, 1991). Posteriormente, la solución se agitó durante 5 minutos y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización. Todo el procedimiento de preparación de la solución de ensayo se llevó a cabo protegido de la luz.

3.1.3.3.2 Animales.

Se utilizaron 32 ratas machos de la línea Sprague Dawley. Estas fueron obtenidas de la Unidad de Cuidado Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de Saskatoon, Canadá), con un peso entre 200 y 320 g.

Durante una semana los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. Las ratas se alojaron en cajas plásticas de suficiente tamaño para permitir su libre movimiento y se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*, además se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz / oscuridad. La temperatura del local se mantuvo controlada (20 ± 2 °C). La comida consistió en pienso estándar para ratas proveniente de la Unidad de Cuidado Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de Saskatoon, Canadá).

3.1.3.3.3 Procedimiento experimental.

3.1.3.3.3.1 Ensayo farmacocinético y de biodistribución.

Administración de la dosis:

Los animales fueron divididos en 8 grupos de acuerdo a los tiempos experimentales. Cada grupo estuvo constituido por 4 ratas. Antes de la administración del compuesto marcado, los animales fueron sometidos a un ayuno de 16 horas con el objetivo de hacer lo más uniforme posible las

condiciones de vaciado estomacal. Posterior a la administración, el ayuno se mantuvo durante 4 horas, con libre acceso al agua.

Las ratas previamente pesadas recibieron una dosis oral única de ^{14}C -G1 en Miglyol[®] 810 N de 100 mg/Kg de peso. El volumen de administración fue de 5mL/Kg de peso. La administración oral se realizó con una aguja de canulación (16G, 3 in.) y los animales estaban en estado consciente.

Colección y análisis de las muestras:

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intramuscular (ketamina / xilazina, SIGMA, USA) 100mg/Kg de peso, de acuerdo al protocolo de anestesia por inyección intraperitoneal en roedores, establecido en el laboratorio.

Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca, a las 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de la administración oral. La sangre se colectó en 2 tubos heparinizados (Becton & Dickinson Vacutainer Systems, UK) que fueron suavemente invertidos durante unos minutos para lograr una mezcla completa con el anticoagulante. Posteriormente uno de los tubos se centrifugó (3000 rpm. 15 minutos, a 4°C, Hettich Rotanta/p, Germany) para obtener el plasma sanguíneo. Tanto las muestras de sangre como las de plasma se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

A los mismos intervalos de tiempo, se realizó una incisión abdominal y se tomaron muestras de diferentes tejidos y órganos tales como: hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro, intestino delgado, intestino grueso, bazo, estómago, vejiga, piel de la región abdominal, tejido adiposo, nodos linfáticos y contenido estomacal e intestinal. Todas las muestras anteriores fueron lavadas con solución salina con el objetivo de eliminar muestras de sangre, posteriormente se secaron, se pesaron los órganos íntegramente, así como tres fracciones por órgano de aproximadamente 0.1g y se congelaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Se tomaron muestras cuantitativas de orina de las ratas del último grupo experimental (48 horas) a los siguientes intervalos de tiempo 0-4, 4-8, 8-12, 12-24, 24-36 y 36-48 horas. Luego se almacenaron a -20°C para evitar la oxidación, evaporación y posible degradación bacteriana.

Las muestras de heces fecales se colectaron cuantitativamente a los animales del último grupo experimental en los intervalos de tiempo siguientes: 0-12, 12-24, 24-36 y 36-48 horas, luego se congelaron a -20°C hasta su procesamiento para determinar la radioactividad total.