



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD DE 5-O- β -D
GALACTOPIRANOSIL-7-METOXI-3'-4'-DIHIDROXI-4-
FENILCUMARINA EN LA LÍNEA CELULAR MDCK**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
LOURDES CATALINA HERNÁNDEZ MÉNDEZ**



MÉXICO, D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: INÉS FUENTES NORIEGA**

VOCAL: **Profesor: LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMIREZ**

SECRETARIO: **Profesor: LIZ JANNET MEDINA REYES**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARIA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 113, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR, UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Inés Fuentes Noriega

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

SUSTENTANTE:

Lourdes Catalina Hernández Méndez

A mi madre Cecilia Méndez

*Antes de comenzar debo hacer una confesión:
yo con la química llevo una relación pasional,
una de esas relaciones que oscilan entre el amor y el odio.*

VICENTE TALANQUER

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos:

PAPIIT- IT200912

FACULTAD DE QUÍMICA, PAIP: 6390-05

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Colegios de Ciencias y Humanidades por desde pequeña permitirme sentir el orgullo de ser Universitaria. A la Facultad de Química y sus profesores, por formarme como profesionista y recordarme a todo momento el compromiso que tengo con la sociedad.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, por apoyarme y guiarme durante la realización de este proyecto y por recordarme a cada instante lo maravilloso que es dedicarme a ésto.

A la M. en C. Kenneth Rubio Carrasco por sus enseñanzas, por el cariño demostrado, por su ayuda y apoyo incondicional durante la realización de esta tesis y la escritura de la misma.

A Lauro Misael Del Rivero Ramírez, Liz Jannet Medina Reyes y María de Lourdes Mayet Cruz por el tiempo dedicado para revisar y corregir este trabajo. Gracias por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Rachel Mata Essayag y Sol Cristians por permitirnos ser parte y contribuir en este gran proyecto de las 4-fenilcumarinas. Gracias por todas las facilidades para proporcionarnos y trabajar con el fitofármaco.

A Lidia Barrón por todas sus lecciones, por su ayuda y apoyo, pero sobre todo por esa gran amistad que desde siempre me brindó, por enseñarme a amar este proyecto y por demostrarme que cuando se ama lo que se hace las mejores recompensas vienen por sí solas.

A Francisco Sánchez Bartz y todo el equipo UNEXA por su ayuda y apoyo en el laboratorio de cultivo celular.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por las facilidades brindadas para el uso del fluorómetro.

A Magaly Mares Sánchez por el tiempo brindado para resolver mis dudas y enseñarme a trabajar las técnicas.

A la Dra. Blanca Rivero Cruz por su apoyo, sus enseñanzas y su amistad. Gracias por lo buena persona que siempre fue conmigo.

A mis compañeros del laboratorio 113, Angélica Díaz, Miguel Bencomo Cruz, Paulina Osnaya, Gabriela García y Alejandra Martínez, gracias por estar siempre para ayudarme y

cuidarme, por hacer tan agradables mis largas horas de trabajo y por supuesto, gracias por esa sincera amistad que me brindaron. A César Olivares por su amistad y ayuda, gracias por las tardes tan entretenidas en el laboratorio, de verdad que es difícil encontrar a alguien tan compatible con mi maldad. A Marisol y Diana, gracias por su apoyo fuera y dentro del laboratorio. Gracias por compartir no sólo las alegrías sino también la desesperación y la tristeza, gracias por estar en los momentos más difíciles. Ustedes mis compañeros y colegas del 113 son lo que la vida llama, verdaderos amigos.

A mis compañeras del laboratorio de cultivo celular, Tannya Castro, por su apoyo, ayuda, amistad y compañía, gracias por confiar en mí y por todas esas pláticas de mutuo desahogo y motivación. A Erika Manzano, no sólo por ayudarme y enseñarme a trabajar en el laboratorio, sino también por ser mi compañera de alegrías, desvelos, desesperación y frustraciones desde nuestro primer día en la Facultad, gracias por creer siempre en mí y alentarme a cada momento. A Jonathan, Pablo y Quetzal, gracias también a ustedes por ser parte de este proceso.

A mis amigos, Laura, Sofía, Mariana, Mónica, Marisela y Víctor por su ayuda y apoyo a lo largo de la carrera, por esos excelentes momentos en la Facultad, gracias por compartir conmigo ese gran gusto y amor por la química.

A Janis y Ana Paulina por ser mis mejores amigas desde hace ya muchos años, por no desistir y continuar junto a mí en este largo camino. Gracias por estar para dar un paso más en este sueño que inició con ustedes afuera de los laboratorios de Biología de nuestro adorado CCH.

A Ezequiel Nava Pintor por su amistad y cariño, por escucharme cuando estaba cerca, por esas pequeñas caminatas que tanto disfrutaba después de clase, gracias ahora por ser mi compañero de desvelos, por leerme a diario durante estos largos meses pero sobre todo, gracias por enseñarme que la distancia medida en kilómetros no es un indicativo de lo cerca o lejos que pueden estar las personas. Gracias por esa agradable compañía que me brindas aún cuando según la geografía estás lejos.

A mi familia, por todo el apoyo y confianza que siempre me han tenido, por enseñarme a luchar por todo lo que quiero, por ayudarme a tener los pies sobre la tierra, por ser mi mayor ejemplo y por darme las fuerzas que necesitaba cuando las mías comenzaban a agotarse. A mis padres, Cecilia y Pedro, gracias por esos grandes esfuerzos que siempre han hecho para hacer de mí una gran persona, gracias por ser mi principal motor para concluir mis proyectos. A mi hermano mayor Aurelio, por demostrarme que siempre puedo llegar hasta donde me lo proponga, por despertar en mí ese interés por la ciencia y por esos pequeños consejos para hacer de mi trabajo algo mejor. A mi hermana Sandra por esas largas charlas imaginando nuestro futuro, por sus consejos, por creer en mí y apoyarme en todo, gracias por ser mi mejor amiga y por esa maldad que alegra mis días.

Mi cariño y agradecimiento para todos, en verdad que sin cada uno de ustedes este proceso no hubiera sido lo mismo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
ABREVIATURAS	12
1. ANTECEDENTES	14
1.1 Diabetes mellitus	15
1.2 Incidencia y tratamiento	17
1.3 Plantas medicinales	18
1.4 Plantas medicinales en el tratamiento de la DM2: <i>Hintonia latiflora</i>	20
1.5 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina	22
1.6 Desarrollo de nuevos medicamentos	22
1.7 Citotoxicidad celular	24
1.8 Absorción de fármacos	25
1.9 Mecanismos de transporte	29
1.10 Biodisponibilidad y permeabilidad	33
1.11 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)	33
1.12 Modelos experimentales para estudiar la permeabilidad	34
1.12 Uso de cultivos celulares	37
1.14 Madin Darby Canine Kidney (MDCK)	39
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	41
4. METODOLOGÍA	42
4.1. Material y Equipo	42
4.2 Material Biológico	43
4.3 Compuesto evaluado	43
4.4 Preparación de soluciones	43
4.4.1 Cultivo y Proliferación Celular	43
4.4.2 Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular	44

4.4.3 Ensayos de Permeabilidad	45
4.4.4 Método Bioanalítico	48
4.5 Procedimiento Experimental	51
4.5.1 Cultivo Celular	51
4.5.2 Ensayos de inhibición de la proliferación celular	53
4.5.3 Estudios de permeabilidad	55
4.5.4 Preparación de la monocapa celular en Celdas Transwell	56
4.5.5 Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER)	57
4.5.6 Transporte en el sentido apical-basolateral (AP-BS)	57
4.5.7 Transporte en el sentido basolateral- apical (BS-AP)	58
4.5.8 Evaluación de la integridad de la monocapa celular con Lucifer Yellow	58
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1 Ensayos de inhibición de la proliferación celular	61
5.2 Estudios de permeabilidad	64
6. CONCLUSIONES	78
7. REFERENCIAS	79
ANEXO 1	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales grupos farmacológicos en el tratamiento de la diabetes tipo 2, clasificados por el mecanismo de acción.	19
Tabla 2. Modelos para evaluar la absorción intestinal	36
Tabla 3. Principales ventajas del uso de cultivos celulares en la investigación científica	38
Tabla 4. Preparación de la Curva Patrón de 4-fenilcumarina	49
Tabla 5. Preparación de curvas patrón de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina.	51
Tabla 6. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de 4-fenilcumarina en solución amortiguadora de Hank pH 7.45.	59
Tabla 7. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de clorhidrato de propranolol en solución amortiguadora de Hank pH 7.45.	59
Tabla 8. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de clorhidrato de ranitidina en solución amortiguadora de Hank pH 7.45	60
Tabla 9. Porcentajes promedio de inhibición de la proliferación de la línea celular MDCK al evaluar la acción de 4-fenilcumarina y cis-platino, empleando el método colorimétrico de SRB.	62
Tabla 10. Velocidad de transporte promedio (n=3) de 4-fenilcumarina, clorhidrato de propranolol (estándar de alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (estándar de baja permeabilidad) en dirección AP-BS y BS-AP a través de monocapas celulares de MDCK.	70
Tabla 11. Coeficiente promedio de permeabilidad aparente (n=3) en dirección AP-BS y BS-AP a través de monocapas celulares de MDCK y relación de coeficientes de permeabilidad de 4-fenilcumarina, clorhidrato de propranolol (alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (baja permeabilidad).	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	21
FIGURA 2. Estructura química de la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi- 4-fenilcumarina	22
FIGURA 3. Barreras de absorción de fármacos en el intestino	26
FIGURA 4. Anatomía del intestino delgado	28
FIGURA 5. Estructura de células epiteliales	29
FIGURA 6. Mecanismos de transporte de fármacos	30
FIGURA 7. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	34
FIGURA 8. Células MDCK tipo II	40
FIGURA 9. Ensayos de inhibición de la proliferación celular	54
FIGURA 10. Celda Transwell	56
FIGURA 11. Inhibición del crecimiento celular	62
FIGURA 12. Formación de monocapa celular sobre membrana semipermeable de PTFE	65
FIGURA 13. Señales cromatográfica de los estándares de permeabilidad	67
FIGURA 14. Señal cromatográfica de 4-fenilcumarina	68
FIGURA 15. Velocidad de transporte	71
FIGURA 16. Velocidad de transporte (dQ/dt)	73
FIGURA 17. Coeficientes de permeabilidad aparente (Paap)	76

RESUMEN

La diabetes mellitus es el trastorno endocrino más común a nivel mundial, se caracteriza por estados de hiperglucemia debidos a la deficiencia en la producción o acción de la insulina (Ross y Pawlina, 2008). Su creciente incidencia y el aumento de la mortalidad debido a este síndrome hacen de ella un reto de salud global que exige el desarrollo de nuevos medicamentos útiles para su tratamiento.

La 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina es un compuesto orgánico aislado a partir de las hojas de *Hintonia latiflora* Bullock conocida popularmente como "Copalchi" o "Quina amarilla", al cual se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes que lo convierten en un principio activo útil para el tratamiento de la diabetes mellitus (Guerrero-Analco *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009).

El desarrollo de nuevos fármacos implica varias etapas, entre las que destaca la evaluación de propiedades biofarmacéuticas como la absorción. Se ha propuesto que la absorción intestinal de un fármaco sea estimada mediante la permeabilidad del compuesto a través de modelos que simulen dicho proceso (De Miguel *et al.*, 2012; Panchagnula y Thomas, 2000; Herrera *et al.*, 2012). Aún cuando sin duda, los estudios en animales y/o humanos son más completos, actualmente la sociedad demanda medicamentos cada vez más eficaces y seguros, a la vez que exige una utilización racional de animales de ensayo, razón por la cual hoy en día la FDA acepta el uso de modelos biológicos *in vitro* empleando cultivos celulares como una nueva alternativa para el desarrollo de estudios de permeabilidad (FDA, 2000).

En el presente trabajo, como parte de la caracterización farmacocinética de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, se estudió la permeabilidad y el tipo de transporte que favorece la absorción del fitofármaco en la membrana intestinal, empleando cultivos celulares de la línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney) como modelo biológico *in vitro*. Para ello, se determinó la citotoxicidad de la 4-fenilcumarina en la línea celular MDCK, en un rango de concentraciones de 0.1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ mediante el método colorimétrico de Sulforrodamina B (SRB), utilizando cis-platino como control positivo en concentraciones de 0.01 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados mostraron que no existe un efecto citotóxico significativo del fitofármaco sobre las células. Para los estudios de permeabilidad, las células formaron monocapas continuas sobre soportes semipermeables de politetrafluoroetileno (PTFE). Al quinto día de cultivo se evaluó el transporte de la 4-fenilcumarina en sentido apical-basolateral (AP-BS) y basolateral-apical (BS-AP) a las concentraciones de 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, utilizando clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina a 8 $\mu\text{g/ml}$ como estándares de alta y baja permeabilidad, respectivamente. La velocidad de transporte (dQ/dt) y el coeficiente de permeabilidad aparente ($Paap$) a cada concentración indicaron que el fitofármaco se absorbe moderadamente a través de un transporte por difusión pasiva aparente. El modelo *in vitro* empleado, proporcionó datos confiables y reproducibles, lo que demuestra su aptitud como técnica para estudios de absorción de nuevos fármacos.

ABREVIATURAS

4-FENILCUMARINA	5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina
ADA	American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADO	Antidiabéticos orales
AP	Apical
ATF	Ácido trifluoroacético
ATP	Adenosina trifosfato
BS	Basolateral
CaCl₂·2H₂O	Cloruro de calcio dihidratado
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-4	Dipeptidil-peptidasa-4
(dQ/dt)	Velocidad de transporte
EMA	European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos)
FID	Federación Internacional de Diabetes
GLP-1	Glucagon-like peptide-1 (Péptido similar al glucagón tipo 1)
GLP-1R	Receptor específico a GLP-1
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
HR	Humedad relativa
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50 (Concentración Inhibitoria 50)
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferencia Internacional de Armonización)
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potasio
MAI	Membranas Artificiales Inmovilizadas
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MDCK-MDCR1	Madin Darby Canine Kidney con el gen mdcr1
MeOH	Metanol
MgSO₄·7H₂O	Sulfato de magnesio anhidro
MRPs o MDRs	Multidrug Resistance Proteins y Multi Drug Resistance (Proteínas de Multirresistencia a Fármacos)
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
Paap	Coeficiente de permeabilidad aparente
PAMPA	Ensayo de permeación con membranas artificiales en paralelo
P-gp	Glicoproteína-P
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
PTFE	Politetrafluoroetileno
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SFB	Suero Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TEER	Resistencia Eléctrica Transepitelial



1. ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa actualmente considerada como la epidemia del siglo XXI y como un reto de salud global (Federación Internacional de Diabetes, FID, 2013; Hernández-Ávila *et al.*, 2013). Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos, ya sea obtenidos por síntesis química o a partir de una fuente natural como las plantas, que puedan utilizarse para su tratamiento es de gran importancia.

A pesar de la innovación en los métodos de administración de fármacos en las últimas décadas, la vía oral sigue siendo por mucho la vía de administración predilecta en virtud de su conveniencia, los bajos costos y el alto cumplimiento del paciente en comparación con rutas alternativas (Balimane *et al.*, 2000). El proceso de absorción de un fármaco administrado oralmente depende principalmente de la liberación del fármaco de la forma farmacéutica, descrito por la cinética de disolución de ésta, así como de la solubilidad y permeabilidad del fármaco en condiciones fisiológicas. Actualmente existe una necesidad práctica por mejorar la evaluación de la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral, pues se estima que el 40% de las moléculas que son candidatas a fármacos no logran llegar al mercado debido a propiedades biofarmacéuticas inadecuadas (baja solubilidad, permeabilidad y/o estabilidad metabólica). De manera que, para lograr el diseño de una forma de dosificación apropiada es necesario conocer detalladamente las características de la molécula y su proceso de absorción. Se ha propuesto que la absorción intestinal de un fármaco sea estimada mediante la permeabilidad del compuesto a través de modelos que simulen el proceso de absorción (Herrera *et al.*, 2012). Aún cuando sin duda los estudios en animales y/o humanos son más completos, por cuestiones de bioética actualmente se prefieren otras alternativas como el uso de cultivos celulares para la evaluación de la absorción de fármacos. En el presente trabajo y como parte de la fase preclínica de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina se trató de dilucidar la permeabilidad y el tipo de transporte que favorece el paso del fitofármaco a través de la membrana intestinal.



1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un síndrome clínico de etiología diversa, cuyas manifestaciones incluyen alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas, se caracteriza por un estado de hiperglucemia, esto es, el aumento de la concentración de glucosa en sangre, y glucosuria, la presencia de glucosa en la orina (Puig-Domingo y De Leiva, 1995), atribuidas ambas a la deficiencia en la secreción o acción de la insulina. La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans, es el producto de secreción endócrina más abundante y ejerce sus efectos principales sobre el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Una glucemia superior a la normal de 70 mg/100 ml (70 mg/dl) estimula la liberación de insulina desde las células β , lo que conduce a la captación de glucosa de la circulación y su almacenamiento por el hígado y el músculo. La disminución de la glucemia resultante detiene la secreción de insulina (Ross y Pawlina, 2008).

Una persona con diabetes no absorbe adecuadamente la glucosa, de modo que sigue circulando por la sangre (hiperglucemia), lo cual con el tiempo daña a los tejidos del cuerpo y puede conducir a una discapacidad y a complicaciones de salud que pueden llegar a ser mortales (FID, 2013). La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño a largo plazo, disfunción e insuficiencia de diversos órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Entre los síntomas de una marcada hiperglucemia se encuentran la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión nublada (American Diabetes Association, ADA, 2007).

Existen tres grandes tipos de diabetes: *diabetes mellitus tipo 1* (insulinodependiente), *diabetes mellitus tipo 2* (no insulinodependiente) y *diabetes gestacional*; aunque también existen otros tipos específicos de diabetes como la producida por defectos genéticos de células β y en la acción de la insulina, endocrinopatías, la inducida por fármacos, agentes químicos o infecciones virales, etc. Asignar un tipo u otro de diabetes a un individuo depende mucho de las circunstancias al momento del diagnóstico, pues pueden padecer más de un tipo,



o bien puede un tipo desencadenar en otro distinto (Permutt *et al.*, 2005; ADA, 2007).

La *diabetes mellitus tipo 1* es considerada como una enfermedad autoinmune en la que linfocitos T se infiltran a los islotes pancreáticos y destruyen a la población de células β productoras de insulina, lo que explica el carácter de “dependencia” del tratamiento de insulina exógena para la supervivencia (Åkerblom *et al.*, 2002; Puig-Domingo y De Leiva, 1995; Permutt *et al.*, 2005).

La *diabetes mellitus tipo 2* (DM2) es una compleja alteración metabólica caracterizada por una combinación de resistencia a la insulina y alteración en la secreción de la misma, causadas por complejas interacciones entre factores ambientales y ciertos factores genéticos (Kota *et al.*, 2012). Se ha demostrado que algunos pacientes con DM2 sintetizan una insulina anómala, biológicamente menos activa, como resultado de una mutación en el gen de la insulina (Puig-Domingo y De Leiva, 1995). Varios factores de riesgo son usados para predecir el desarrollo de este tipo de diabetes, los cuales incluyen una historia familiar de diabetes y características fenotípicas fácilmente medibles asociadas a lo que se denomina como síndrome metabólico (tales como obesidad, hipertensión, bajos niveles de colesterol HDL, elevados niveles de triglicéridos y alteración de la glucosa en ayunas) (Ascaso, 2014; Kota *et al.*, 2012).

La *diabetes gestacional* se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo (Permutt *et al.*, 2005; ADA, 2007) y tiende a ocurrir por lo general alrededor de la semana 24. Este tipo de diabetes normalmente desaparece después del nacimiento. Sin embargo, las mujeres que han tenido diabetes gestacional tienen un mayor riesgo de volver a desarrollarla en embarazos posteriores y de desarrollar diabetes tipo 2 más adelante en la vida. Los bebés que nacen de madres con diabetes gestacional también tienen un mayor riesgo de obesidad y DM2 en la adolescencia o en la edad adulta temprana (FID, 2013).



1.2 Incidencia y tratamiento

En todas sus formas, la diabetes impone costos humanos, sociales y económicos inaceptablemente altos en países de todos los niveles de ingresos; sin embargo, afecta de manera desproporcionada a los países de ingresos medios y bajo en términos de prevalencia, mortalidad y morbilidad. Hasta el 80% de las personas con diabetes viven en países en vías de desarrollo, donde los cambios rápidos del estilo de vida, el envejecimiento de la población y la transformación del entorno contribuyen al creciente ritmo de la epidemia. Se estima que tienen diabetes aproximadamente 382 millones de personas en el mundo, o el 8,3% de los adultos. Si sigue esta tendencia, para el año 2035 unos 592 millones de personas, o un adulto de cada 10, tendrán diabetes. De acuerdo a datos de la Federación Internacional de Diabetes (2013) México es el sexto país con mayor número de personas diabéticas a nivel mundial, con 8,7 millones, antecedido por China, India, Estados Unidos, Brasil y Rusia. En lo que a mortalidad se refiere, la diabetes y sus complicaciones son las principales causas de muerte prematura en la mayoría de los países. En nuestro país, en 2011 y 2012, fue la segunda causa de muerte a nivel nacional, de cada 100 mil personas que murieron, 70 fallecieron por diabetes (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI, 2013).

De los tipos de diabetes descritos anteriormente y a pesar de ser la única que se puede prevenir por estar relacionada con el estilo de vida de la población, la DM2 es el tipo más común (INEGI, 2013). Por lo general ocurre en adultos, pero cada vez más aparece en niños y adolescentes (FID, 2013).

Dado que éste tipo de diabetes tiene un periodo de latencia largo con una fase preclínica que puede pasar desapercibida, la posibilidad de que los pacientes sean detectados en forma tardía es alta (Jiménez-Corona *et al.*, 2013), estas personas suelen ser diagnosticadas sólo cuando las complicaciones de la diabetes ya se han desarrollado. El tratamiento es muy complejo, incluye el control de la glucemia, alcanzar objetivos terapéuticos sobre la presión arterial y los lípidos en sangre (FID, 2013). Todas las sociedades científicas consideran adecuado el tratamiento escalonado: 1) cambios en el estilo de vida (cambios en la dieta,



ejercicio físico, educación diabetológica, abstención de fumar) asociados a monoterapia oral con metformina u otros fármacos según las características del paciente (**Tabla 1**); 2) combinaciones de antidiabéticos orales (ADO) o análogos del glucagon-like peptide-1 (GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1), con asociación de 2 o 3 fármacos; 3) combinación de insulina basal con ADO o GLP-1; y 4) múltiples dosis de insulina o en casos resistentes con obesidad mórbida, cirugía metabólica. (Ascaso, 2014; Pedrianes *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2012).

1.3 Plantas medicinales

Las plantas son únicas en su capacidad para producir una extraordinaria variedad de diferentes metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen atributos medicinales y/o tóxicos. Las cualidades medicinales de las plantas han sido valoradas por el hombre desde hace siglos (Barthelson *et al.*, 2006). Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades. Algunos estudios revelan que los pacientes que sufren determinados trastornos crónicos utilizan servicios de medicina tradicional con mayor frecuencia (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2013). Se estima que alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente con medicamentos tradicionales sus necesidades de atención primaria de salud. En los países en desarrollo, el uso de plantas medicinales ayuda a reducir la importación de medicamentos, promoviendo así la autosuficiencia (Akerle, 1993).

Nuestro país tiene una rica tradición herbolaria, es considerado como el segundo país con mayor número de especies botánicas con uso medicinal, su gran diversidad vegetal y su amplia riqueza cultural han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas, nuestros antepasados indígenas usaban con sabiduría una gran variedad de plantas medicinales que hoy en día muchos mexicanos siguen utilizando (Cristians, 2009; García de Alba *et al.*, 2012; Hoogesteger, 1994). Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, el número de plantas medicinales que han sido estudiadas fitoquímicamente no rebasa el 10% y evaluadas farmacológicamente

Tabla 1.
Principales grupos farmacológicos en el tratamiento de la diabetes tipo 2, clasificados por el mecanismo de acción

Insulinosensibilizadores: Aumentan la sensibilidad a la insulina y facilitan su acción periférica, disminuyen la resistencia a la insulina y la producción hepática de insulina.

Biguanidas (metformina). Tratamiento de primera elección de la hiperglucemia en pacientes diabéticos pues produce escasos efectos secundarios generales y nula ganancia de peso, aunque en algunos estudios se han descrito pérdidas moderadas de la masa corporal, acompañada de una disminución del apetito, no produce hipoglucemias y presenta un razonable costo económico. Respecto al perfil lipídico, produce disminución de los valores de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos. En general, es un fármaco seguro que ha demostrado ser eficaz en combinación con otros ADO, como las sulfonilureas, con las que presenta efectos aditivos.

Glitazonas (pioglitazona). Su efecto se produce por activación de los receptores PPAR γ . Como efectos adversos no produce hipoglucemia, provoca una ganancia de peso de entre 1 y 4 Kg y aumenta la incidencia de fracturas óseas en mujeres posmenopáusicas. Contraindicado en pacientes con insuficiencia hepática.

Insulinosecretagogos: Estimulan la secreción de la insulina por las células β .

Sulfonilureas (clorpropamida, glibenclamida, glimepirida). Interaccionan con receptores específicos conocidos como SUR-1 en la célula β pancreática. Sus efectos adversos incluyen incremento de la incidencia de hipoglucemias y aumento del peso corporal de alrededor de 3-4 Kg a lo largo de los primeros 6 meses de tratamiento, con estabilización posterior.

Metiglinidas (repaglinida, nateglinida). Ejercen su acción a través del receptor SUR-1, pero en un lugar de unión diferente al de la sulfonilurea

Su efecto es más rápido y corto que el de los demás secretagogos, así también la incidencia de hipoglucemias y su efecto sobre el peso corporal son menores.

Potenciadores del efecto incretina: Las incretinas son liberadas a la circulación por las células intestinales en respuesta a la ingesta de alimento, y tienen una acción insulínica, así como un descenso en la secreción de glucagón.*

Análogos del GLP-1 (liraglutida y albiglutida). Moléculas de GLP-1 con mínimas modificaciones en su estructura, para evitar la hidrólisis por las DPP-4, estimulan los GLP-1R. Son un grupo muy interesante en el tratamiento de la DM2 por sus efectos hipoglucemiantes, no acompañados de aumento significativo de hipoglucemias, pérdida moderada (pero significativa) de peso corporal y con la posibilidad de favorables efectos cardiovasculares y protección del islote. Sin embargo, tienen un elevado precio.

Miméticos de la incretina (exenatida y exenatida LAR). Moléculas con elevada homología con el péptido nativo GLP-1 que reproducen los efectos biológicos del GLP-1 al interaccionar con su receptor. Presentan un bajo riesgo de hipoglucemia, disminución de la secreción de glucagón y producen disminución del peso corporal en unos 3-4 Kg.

Inhibidores de la DPP-4 o gliptinas (sitagliptina, vildagliptina, etc.). Su mecanismo de acción se basa en prolongar la vida media de las incretinas inhibiendo de forma competitiva y reversible la acción de la DPP-4. No producen hipoglucemia ni aumento de peso. Tienen el inconveniente del alto precio.

Inhibidores de las α -glucosidasas intestinales: Su efecto hipoglucemiante se basa en la inhibición de las enzimas que degradan los glúcidos complejos procedentes de la dieta en monosacáridos y disacáridos que pueden absorberse en la luz intestinal, la absorción y digestión de los carbohidratos se retrasa y prolonga por todo el intestino delgado.

Acarbosa y miglitol. No producen hipoglucemia ni aumento del peso corporal si no se asocian a otros ADO. Sus efectos adversos son fundamentalmente gastrointestinales: plenitud y molestias abdominales, flatulencia, meteorismo y diarreas.

*El efecto incretina es el fenómeno por el cual la ingesta de glucosa por vía oral produce un incremento de la secreción de insulina superior a la administración de cantidades similares de glucosa por vía intravenosa. **GLP-1:** glucagon-like peptide-1 (péptido similar al glucagón tipo 1); **GLP-1R:** Receptor específico a GLP-1; **LAR:** long-acting release (liberación retardada); **DPP-4:** dipeptidil-peptidasa-4; **PPAR γ :** peroxisoma-proliferador-activado γ ; **SUR-1:** receptor de sulfonilureas-1. (Basado en Pedrianes y De Pablos, 2010; Ascaso, 2014 y Romero, 2012).



son menos del 5% (Schlaepfer y Mendoza- Espinoza, 2010), lo que nos lleva a inferir que la herbolaria es un recurso básico de la medicina popular, pero nuestro conocimiento de ella es escaso e impreciso (García de Alba *et al.*, 2012).

1.4 Plantas medicinales en el tratamiento de la DM2: *Hintonia latiflora*

La medicina tradicional es utilizada en particular por pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, pues la adoptan como productos y prácticas que suponen que al ser naturales son seguros, además de que la posibilidad de reducir gastos es un motivo importante para recurrir a ella (OMS, 2014; WHO, 2004). Actualmente, en México, al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias se utilizan para tratar la DM2 (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Entre las diversas hierbas usadas en la medicina popular mexicana existe varias plantas de la familia Rubiaceae, conocidas por sus propiedades para reducir la glucemia. Estas incluyen a la *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *Hintonia standleyana* Bullock y *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult, las cuales conforman al complejo conocido como copalchi (Cristians, 2013).

La especie pilar del complejo, *Hintonia latiflora*, se encuentra distribuida en el oeste y suroeste de México y Guatemala, es un arbusto o árbol de hasta 8 m de alto, con hojas ovaladas de 4 a 12 cm de largo; las flores acampanadas, son blancas de 5 a 7 cm y aromáticas; el fruto es capsulado con semillas pequeñas y aladas (**Figura 1**). Se conoce popularmente con los nombres de copalchi, copalquín, falsa quina, quina amarilla, corteza de Jojutla, campanilla, palo amargo, entre otros (Martínez, 1996). La planta florece en los meses de febrero y marzo, llegando a presentar una floración extemporánea en el mes de junio, las hojas están presentes entre los meses de febrero y octubre (Cristians, 2009). Los estudios realizados sobre la actividad farmacológica de *H. latiflora* son numerosos, su amarga corteza es altamente valorada por sus propiedades antidiabéticas, las cuales han sido reportadas por numerosos estudios farmacológicos en animales, lo que hace del extracto copalchi un potencial agente terapéutico para los pacientes con DM2 (Guerrero-Analco *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009).



FIGURA 1. a) *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock **b)** Reproducción de la ilustración realizada durante las expediciones de Sessé y Mociño por Nueva España, se puede leer la anotación hecha posteriormente que dice: *Coutarea latiflora copalchi*, sinonimia de *H. latiflora*. (Tomados de Cristians, 2013).

Por más de 400 años la corteza de *H. latiflora* ha sido comercializada, los grandes volúmenes de extracción, aunados a la falta de políticas y estrategias para su explotación sustentable, ha generado que esta rubiácea tenga mermadas sus poblaciones nativas y se encuentre en peligro de extinción. Este escenario motivó el interés por el estudio de las hojas (Cristians, 2013). Recientemente Cristians y colaboradores (2009) comprobaron el potencial antidiabético de las hojas de *H. latiflora*, presentando tanto propiedad antihiper glucémica como hipoglucemiante significativa. El efecto antihiper glucémico de las hojas está relacionado con su contenido de metabolitos secundarios con propiedades antidiabéticas, principalmente las 4-fenilcumarinas (Guerrero-Analco *et al.*, 2005 y Guerrero, 2007), el ácido ursólico y el ácido clorogénico (Cristians, 2013). Por otro lado, se establecieron los parámetros que permitieron conocer el perfil químico de la infusión de las hojas. Con toda esta información, se consideró factible sugerir la sustitución del uso de la corteza por el de las hojas de *H. latiflora*, proponiendo la formulación de un preparado fitoterapéutico coadyuvante en el control de los niveles de glicemia en pacientes diabéticos, o inclusive con actividad profiláctica en individuos normoglucémicos, la cual consistiría en una tisana a partir de 1.5 g de hojas secas y fragmentadas de *H. latiflora*. Los estudios farmacocinéticos



preliminares de glicósidos de 4-fenilcumarinas, aportan datos fundamentales para la formulación del preparado fitoterapéutico (Cristians, 2013).

1.5 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

Como parte de los glicósidos de 4-fenilcumarina considerados para su estudio farmacocinético por su disponibilidad en cantidades suficientes y por su presencia en las tres rubiáceas del complejo copalchi, se encuentra la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4-fenilcumarina) (**Figura 2**), la cual consiste en un sólido amorfo de color beige o amarillo de peso molecular de 462 g/mol, punto de fusión de 228-231°C y coeficiente de partición de 3.35 (datos no publicados); aislado mediante la cristalización con metanol (MeOH) del concentrado obtenido a partir de la maceración de las hojas de *H. latiflora* con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1), (Cristians, 2013; Guerrero, 2007).

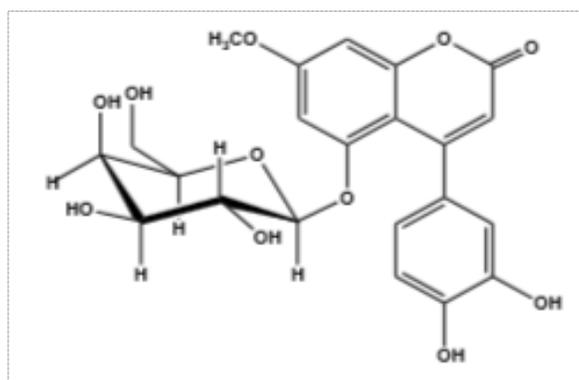


FIGURA 2. Estructura química de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina; C₂₂H₂₂O₁₁; PM: 462 g/mol. (Tomado de Guerrero, 2007).

1.6 Desarrollo de nuevos medicamentos

El desarrollo de un nuevo medicamento es un proceso largo, complejo y costoso, donde las probabilidades de éxito, en retrospectiva, son bajas y cuyo objeto es demostrar en distintas fases, *descubrimiento*, *preclínica* y *clínica*, que el nuevo fármaco reúne los requisitos de eficacia, seguridad y calidad exigidos para su comercialización y administración al ser humano. Hoy en día se considera que para que un nuevo fármaco culmine todo el proceso desde su descubrimiento hasta su utilización clínica éste puede durar entre 8 y 12 años, y que el interesado



debe invertir entre 500 y 1000 millones de dólares (Pauwels, 2006; San Román del Barrio, 2013; De Miguel *et al.*, 2012)

El descubrimiento de un nuevo medicamento implica procesos como la identificación de candidatos, su síntesis, caracterización fisicoquímica, rastreo y pruebas de eficacia terapéutica. El principio activo debe estar muy bien definido químicamente desde los inicios del desarrollo, pues cualquier pequeña modificación en su composición o sus propiedades fisicoquímicas (cristalización, tamaño de partícula, estructura tridimensional, estereoisomería, etc.), podría dar lugar a diferencias importantes en actividad farmacológica, seguridad y eficacia. (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS, 2010; De Miguel *et al.*, 2012).

El desarrollo preclínico de un medicamento se centra en la evaluación de la seguridad, toxicidad y eficacia del principio activo, realizadas en sistemas biológicos diferentes al ser humano (Panchagnula y Thomas, 2000, FDA, 1999; De Miguel *et al.*, 2012).

El método clásico en la elección de fármacos potenciales todavía se basa en la evaluación de la actividad farmacodinámica, en la que se examina más específicamente como el compuesto ejerce su acción farmacológica, cómo interactúa y el tipo de reacciones que tienen lugar a nivel celular, tisular y de órgano, así como la curva de dosis-respuesta. Sin embargo, la mayoría de las moléculas fracasan durante su desarrollo dado que la seguridad y eficacia no sólo se rigen por sus propiedades farmacodinámicas sino también dependen en gran medida de las propiedades biofarmacéuticas (solubilidad, estabilidad, permeabilidad, efecto del primer paso) y farmacocinéticas (tasa de depuración, vida media biológica, unión a proteínas, volumen de distribución), pues son estas las que controlan la velocidad y el grado en el que el fármaco puede alcanzar su sitio de acción (De Miguel *et al.*, 2012; Panchagnula y Thomas, 2000).

La farmacocinética describe lo que le sucede al fármaco por acción del organismo y se realiza inicialmente con el producto puro; depende de la dosis administrada,



de la vía de administración y del estado fisiológico del organismo así como de las propiedades físicoquímicas del compuesto (solubilidad, estabilidad, etc.). En esta fase se estudia la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción del fármaco (ADME). Estos estudios permiten identificar, si los hubiera, efectos tóxicos del compuesto así como la forma de administración más apropiada y la dosis a utilizar. Tradicionalmente los estudios de ADME se realizan en dos especies de mamíferos, una de ellas de roedor, utilizando diferentes dosis y aplicadas a hembras y machos (San Román del Barrio, 2013; De Miguel *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2011).

Algunos datos sobre los motivos de retiro de fármacos candidatos durante la etapa de desarrollo indican que casi el 40% de los medicamentos fracasan a causa de propiedades farmacocinéticas insatisfactorias debido a pobres propiedades biofarmacéuticas, pues aunque las moléculas superan rápidamente la fase preclínica por su toxicidad relativamente baja, la absorción en el humano no es la adecuada (Prentis *et al.*, 1988). De forma simplificada, el fármaco ideal debería tener la mayor eficacia terapéutica y biodisponibilidad, así como la mínima toxicidad posible (Rivera *et al.*, 2013). Por tal motivo, conviene que de ser posible farmacodinamia, toxicología y farmacocinética se lleven a cabo simultáneamente (San Román del Barrio, 2013).

Finalmente, durante la etapa preclínica, también se lleva a cabo el desarrollo químico y farmacéutico, para valorar la viabilidad de la purificación y la síntesis en gran escala, la estabilidad del compuesto en diversas condiciones y el desarrollo de una formulación adecuada para su administración en la fase clínica (San Román del Barrio, 2013).

1.7 Citotoxicidad celular

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado, ya sea mediante la muerte de las células o a través de alguna alteración en su metabolismo (Repetto, 2002).



Los estudios de citotoxicidad son útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de nuevos fármacos. En la estimación de la posible citotoxicidad de éstas moléculas en proceso de investigación se emplean métodos de tinción celular para la medición cuantitativa indirecta del crecimiento y viabilidad celular (Repetto, 2002; Escobar *et al.*, 2009).

Dentro de los ensayos más conocidos se encuentra el método de tinción con sulforodamina B (SRB), el cual fue desarrollado en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos y proporciona un índice del contenido de proteína celular de las células previamente fijadas con ácido trifluoroacético, al unirse selectivamente la SRB a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

1.8 Absorción de fármacos

La absorción oral de medicamentos es el resultado de un proceso complejo que se inicia cuando se ingiere la forma farmacéutica, seguido de la liberación de las moléculas de fármaco de la formulación para posteriormente disolverse en los fluidos fisiológicos, a fin de atravesar las membranas biológicas de los enterocitos, a través de distintos mecanismo de transporte (**Figura 3**; Hellinger y Vastag, 2011; Cao *et al.*, 2008).

La velocidad y el grado de absorción de un fármaco están afectadas por muchos factores, los cuales incluyen factores fisicoquímicos (pKa, solubilidad, estabilidad, lipofilia, área superficial polar-no polar, tamaño de partícula, forma cristalina, etc.), factores fisiológicos (pH gástrico e intestinal, flujo sanguíneo, vaciado gástrico, tiempo de tránsito intestinal y los mecanismos de absorción), y los factores relacionados con la forma de dosificación (tableta, cápsula, solución, suspensión, emulsión o gel) (Dahan *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2008).

El intestino delgado es la sección del sistema gastrointestinal que permite la absorción de nutrientes y que limita la absorción de fármacos, enzimas digestivas y bacterias. Está constituido por estructuras y células con características únicas que le confieren una morfología bastante compleja y especializada, sin embargo,



toda esta estructura creada al interior del mismo tiene como objetivo ampliar el área disponible para que el proceso de absorción pueda llevarse a cabo de una manera sumamente eficaz (Balimane *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2012). El intestino delgado está dividido en tres secciones: duodeno (los primeros 25 cm), yeyuno e íleon (los dos últimos en conjunto tienen una longitud aproximada de 260 cm), siendo en estos dos últimos en donde se lleva a cabo la máxima absorción de los productos farmacéuticos en un período de 3-5 horas y un intervalo de pH de 4.5-8.0 (Silverthorn, 2009; Avdeef, 2003).

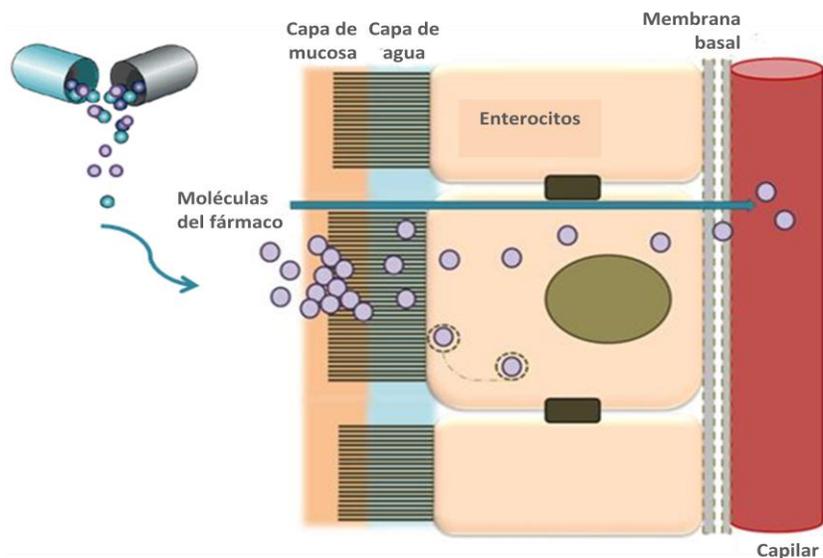


FIGURA 3. Barreras de absorción de fármacos en el intestino. Una vez disueltas, las moléculas del fármaco se encuentran con varias barreras secuenciales antes de poder llegar a la circulación sistémica y distribuirse en los órganos en los que deben actuar, dichas barreras incluyen la capa de mucosa, la capa de agua sin agitación y la capa de células epiteliales; modificado de Fowler, 2013.

La absorción de nutrientes y fármacos se lleva a cabo en la mucosa intestinal, la cual consta de tres capas: la mucosa muscularis, la lámina propia y la capa de células epiteliales (Joyce *et al.*, 1987, tomado de Herrera *et al.*, 2012). La mucosa muscularis se encuentra en la unión entre la mucosa y la submucosa. Es una lámina continua de músculo uniforme con un espesor de 3 a 10 células, compuesta de capas circulares internas y longitudinales externas. Por su parte, la lámina propia es el tejido conectivo dentro del villus que provee soporte estructural



a la capa de células epiteliales, rodea a las criptas de Lieberkuhn y contiene numerosas células de defensa que interactúan con sustancias exteriores que llegan a esta capa desde el tracto gastrointestinal. A través de sus capilares la lámina propia nutre a las células epiteliales, y permite el transporte de las sustancias absorbidas hacia la circulación sistémica. La capa de células epiteliales es una monocapa que contiene células madre que proliferan y migran a lo largo del eje cripta-villus, las cuales conforme migran reciben diferentes señales para diferenciarse, generando así a diferentes tipos de células (Herrera *et al.*, 2012). Está constituida por células columnares altamente polarizadas, es decir, sus membranas plasmáticas están organizadas como mínimo en dos regiones separadas. Típicamente las distintas superficies de una célula epitelial polarizada se denominan: superficie apical (arriba), basal (base o abajo) y lateral (lado). La superficie basal suele entrar en contacto con una matriz extracelular subyacente llamada lámina basal. A menudo las superficies basal y lateral son similares en composición, y juntas se denominan superficie o membrana basolateral. Esta superficie suele estar del lado de la célula más cercana a los vasos sanguíneos (Lodish *et al.*, 2006). La principal función de esta capa de células es la absorción; su superficie apical se caracteriza por estar cubierta de microvellosidades que constituyen el borde en cepillo, con enzimas implicadas en la digestión de los hidratos de carbono. La morfología del borde en cepillo es una característica especial del intestino que aumenta en gran medida el área de la superficie apical, y por ende el número de proteínas que puede contener, aumentando la capacidad absorbente del epitelio intestinal (**Figura 4**; Herrera *et al.*, 2012; Ganong, 2002; Hellinger y Vastag, 2011; Lodish *et al.*, 2006).

Las células intestinales están unidas entre sí por complejos de unión intercelulares que miden de 0.1 a 0.6 μm , llamadas uniones estrechas, las cuales son estructuras multiproteicas dinámicas y complejas con funciones fisiológicamente importantes, mantener la polaridad de los enterocitos, el gradiente de electrolitos y las macromoléculas fuera del cuerpo (Herrera *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2000).

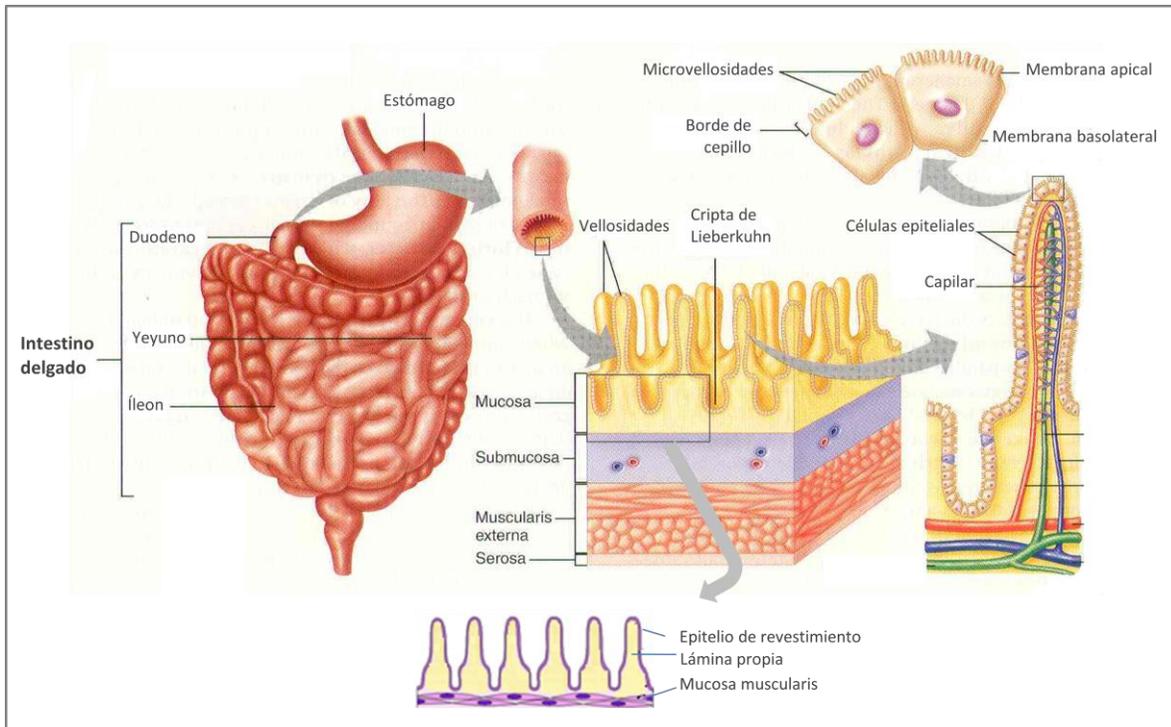


FIGURA 4. Anatomía del intestino delgado. El intestino delgado se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon. La absorción de fármacos ocurre en la mucosa intestinal, formada por la mucosa muscularis, la lámina propia y la capa de células epiteliales. La mucosa muscularis se encuentra en la unión entre la mucosa y la submucosa; la lámina propia es el tejido conectivo dentro del villus que rodea a las criptas de Lieberkuhn. Las células epiteliales poseen una está membrana apical (superficie frente al lumen), y una membrana basolateral (superficie más cercana a los vasos sanguíneos). La membrana apical se caracteriza por estar cubierta de microvellosidades que constituyen el borde en cepillo, gracias al cual la capacidad absorbente del epitelio intestinal aumenta. (Modificado de *Estructura funcional del sistema digestivo*, 2007).

Entre las microvellosidades y el lumen existe una capa de agua sin agitación, que tiene un grosor que varía entre 30 y 100 μm . Esta estructura está constituida por el glicocálix y la capa de mucosa. En el glicocálix se encuentran glicoproteínas, enzimas digestivas y cadenas laterales de los oligosacáridos celulares, mientras que la capa de mucosa se compone de glicoproteínas de alto peso molecular y un 90 % de oligosacáridos. En general, el pH de este microambiente es de 5.2, el cual es independiente del pH luminal (**Figura 5**; Avdeef, 2003; Herrera *et al.*, 2012).

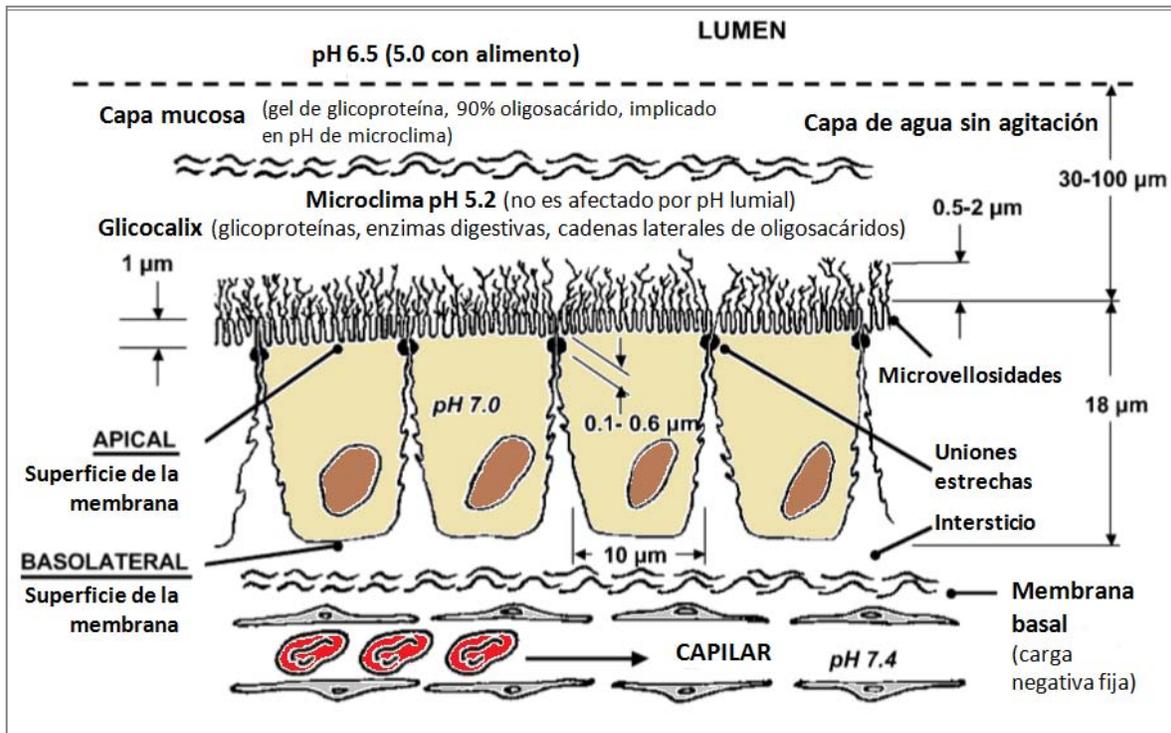


FIGURA 5. Estructura de células epiteliales. Las células epiteliales están unidas entre sí por uniones estrechas. Poseen un borde en cepillo constituido por numerosas microvellosidades, que recubren su superficie apical. La superficie más cercana a los capilares es la superficie basolateral. Entre las microvellosidades y el lumen existe una capa de agua sin agitación constituida por el glicocálix y la capa de mucosa. En el glicocálix se encuentran glicoproteínas, enzimas digestivas y cadenas laterales de los oligosacáridos celulares, mientras que la capa de mucosa se compone de un gel de glicoproteínas y un 90% de oligosacáridos. (Modificado de Avdeef, 2003).

1.9 Mecanismos de transporte

La eficacia de muchos fármacos depende fundamentalmente de su capacidad para que una vez disueltos crucen las barreras celulares (capa de mucosa, capa de agua sin agitación, capa de células epiteliales y tejidos subcutáneos) y puedan llegar desde el lumen intestinal a la circulación sistémica (Chan *et al.*, 2004; Stenberg *et al.*, 2002). El transporte de moléculas involucra procesos tales como difusión pasiva, transporte activo, transporte por vesículas y mecanismos de eflujo. A continuación se da una breve descripción de cada uno de ellos (**Figura 6**).

I. **Difusión pasiva.** Este tipo de transporte interviene en el paso de sustancias susceptibles de disolverse en los constituyentes de la membrana. El paso se da en uno u otro sentido sin ningún gasto de energía y según un gradiente, que puede



ser de mayor a menor concentración o electroquímico, hasta llegar a un estado de equilibrio entre los dos medios. La difusión pasiva incluye la difusión simple, difusión facilitada o mediada por acarreadores y el transporte paracelular. (Herrera *et al.*, 2012; Becker *et al.*, 2007).

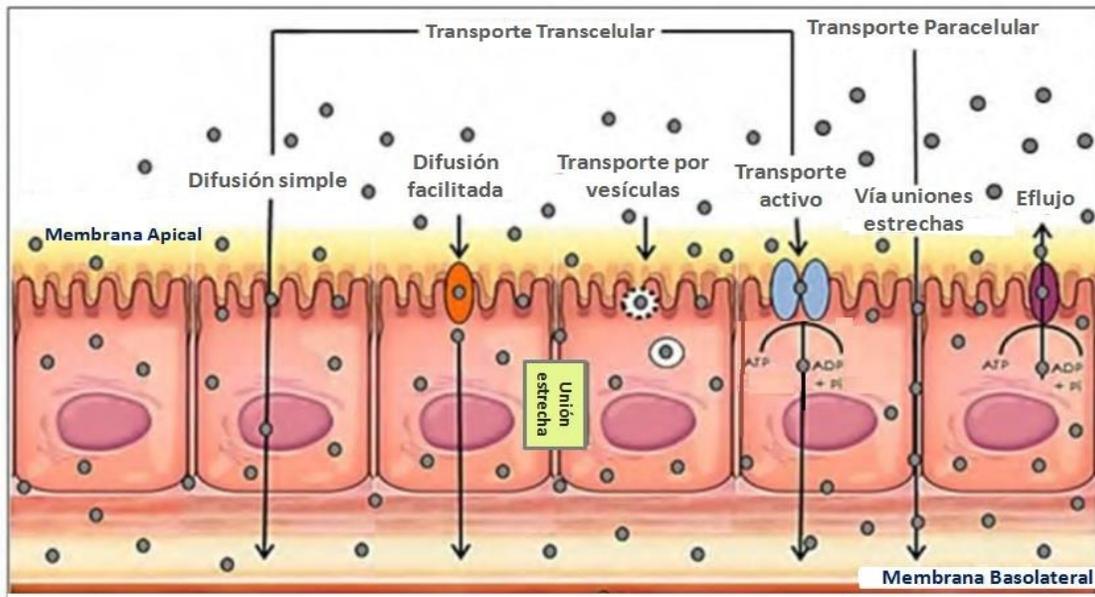


FIGURA 6. Mecanismos de transporte de fármacos. Las moléculas de un fármaco pueden atravesar la membrana epitelial mediante dos vías, la vía o transporte transcelular, en la que el fármaco penetra las membranas de las células intestinales (difusión simple, difusión facilitada, transporte por vesículas, transporte activo, mecanismos de eflujo); y la vía o transporte paracelular, cuando se produce la difusión a través de las uniones estrechas entre las células. (Modificado de Estrada, 2014).

Difusión simple: Es el mecanismo de transporte más habitual puesto que la mayor parte de los fármacos tienen un tamaño pequeño-mediano. Se rige por la primera ley de Fick, según la cual la velocidad de difusión será mayor cuanto mayor sea el gradiente de concentración, menor sea el tamaño de la molécula y mayor sea su liposolubilidad. A su vez, la liposolubilidad depende del grado de ionización: la forma ionizada no difunde a través de la membrana, mientras que la forma no ionizada difundirá hasta que se equilibre la concentración a ambos lados de ella (Avdeef, 2003; Cao *et al.*, 2008).



Difusión facilitada: La mucosa intestinal expresa un gran número de acarreadores o transportadores, mediante los cuales los solutos pueden ser transportados en la dirección apical-basolateral. Estas proteínas extraen nutrientes y otros compuestos esenciales para el organismo de los contenidos luminales por diversos mecanismos. Las características más notables de este tipo de transporte son su especificidad de sustrato, variabilidad regional, saturabilidad e inhibición competitiva. La difusión facilitada tiene mayor velocidad de transporte de lo que se esperaría en comparación con la difusión pasiva. Esta ruta de transporte está disponible para un número limitado de fármacos (Stenberg *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2012; Armijo, 1997; Cao *et al.*, 2008).

Transporte paracelular: Constituye una vía de transporte extracelular a través del epitelio por medio de las uniones estrechas formadas entre las células. Los fármacos ionizados hidrófilos, en su mayoría de bajo peso molecular (200 Da), son absorbidos a través de la ruta paracelular, sin embargo, la absorción a través de esta ruta es generalmente baja, ya que las uniones estrechas intercelulares restringen el libre movimiento transepitelial. Estas uniones estrechas sirven también como barrera para moléculas hidrófilas de gran tamaño. Se considera, que al estar regida por la ley de Fick, la velocidad de transporte en la ruta paracelular es proporcional a la concentración de fármaco en la superficie de la membrana apical. Se estima que la mayor parte de la permeabilidad pasiva del epitelio a los pequeños iones monovalentes y agua, se da mediante este tipo de transporte (Herrera *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2000; Stenberg *et al.*, 2002; Field, 2003).

II. Transporte activo: Las moléculas se transportan contra un gradiente de concentración o contra el potencial electroquímico, por lo que se requiere siempre del aporte de energía. Así pues, las proteínas de membrana implicadas en el transporte activo, deben proporcionar mecanismos, no sólo para mover las moléculas de soluto deseadas a través de la membrana, sino también para acoplar tales movimientos a reacciones que cedan energía, por ejemplo la hidrólisis de ATP (Adenosina Trifosfato). Con frecuencia, el transporte de la



molécula se asocia al de iones (como H^+ o Na^+), que pueden ser transportados en la misma dirección o en dirección contraria. Este mecanismo requiere de un transportador, que es una proteína de membrana capaz de formar un complejo con la molécula del fármaco, para así atravesar la barrera y posteriormente liberar al fármaco al otro lado de ésta última, a la vez que el transportador retoma su conformación original. Como se mencionó anteriormente las características más notables de las proteínas acarreadoras son su especificidad, capacidad de saturación y variabilidad de expresión regional. A diferencia del proceso de difusión, en el transporte activo la velocidad de transporte no depende del gradiente de concentración (Cao *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2007; Armijo, 1997; Herrera *et al.*, 2012).

III. Transporte por vesículas: Las macromoléculas se transportan mediante exocitosis o endocitosis. En la exocitosis, las vesículas intracelulares se fusionan con la membrana expulsando su contenido al exterior. En la endocitosis se forma una invaginación, pequeña en la pinocitosis y grande en la fagocitosis, que engloba las macromoléculas del exterior de la membrana; estas invaginaciones se separan de la membrana celular hacia el interior de la célula, formando vesículas que contienen las macromoléculas (Armijo, 1997).

IV. Mecanismos de eflujo: Transportadores de eflujo, se encargan de mediar la expulsión de compuestos del citoplasma celular hacia el lumen intestinal mediante un proceso llamado eflujo apical (Hidalgo, 2001; tomado de Herrera *et al.*, 2012). Los mecanismos de eflujo intestinal se atribuyen regularmente a proteínas localizadas en la membrana apical pertenecientes a la familia ABC (del inglés, ATP Binding Cassette), tales como la P-glicoproteína (P-gp) y a otras proteínas asociadas a la resistencia múltiple a fármacos conocidas como MRPs o MDRs (Multidrug Resistance Proteins y Multi Drug Resistance, respectivamente). Los transportadores de eflujo presentan baja selectividad y se consideran una limitante para la absorción de fármacos, por lo que el estudio de sus características y afinidades resulta de gran relevancia para la absorción de entidades terapéuticas (Stenberg *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2012).



1.10 Biodisponibilidad y permeabilidad

La biodisponibilidad indica la velocidad y la cantidad de la forma inalterada de un fármaco que accede a la circulación sistémica y, por lo tanto, está disponible para acceder a los tejidos y producir un efecto (Armijo, 1997). La biodisponibilidad oral es el resultado de una compleja serie de eventos: el metabolismo, la solubilidad y la absorción intestinal. Se determina principalmente por su capacidad para moverse a través de la bicapa lipídica del epitelio intestinal y otros revestimientos de células endoteliales. Estos procesos se describen por la permeabilidad como un parámetro esencial. En general, la permeabilidad se define como la capacidad de una molécula para atravesar las membranas biológicas, siendo un parámetro biofarmacéutico muy importante que gobierna la absorción, distribución, metabolismo y excreción (farmacocinética) de un medicamento (Panchagnula y Thomas, 2000). En conjunto con la permeabilidad de la mucosa intestinal, la concentración del fármaco en los fluidos intestinales determinan la tasa de absorción del fármaco (Augustijns *et al.*, 2014).

1.11 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)

El SCB es un marco científico para clasificar a los principios activos en base a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la cinética de disolución del producto farmacéutico, el SCB considera tres factores principales que gobiernan la velocidad y el alcance de la absorción del fármaco a partir de formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal (Amidon *et al.*, 1995). De acuerdo a estos factores, el SCB, elaborado por Gordon Amidon en 1995, divide a los fármacos en cuatro grupos o clases (**Figura 7**).

Un fármaco se considera altamente soluble cuando la mayor concentración posológica es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en el intervalo de pH 1.2-6.8 de acuerdo a la OMS (2005) y de 1.0-6.8 según indica la EMEA (2010) y la FDA en su reciente actualización de la Guía para Bioexenciones (2015). Ante la ausencia de evidencia que sugiera inestabilidad en el sistema gastrointestinal, se considera que el fármaco es altamente permeable cuando se determina que la



medida de absorción en el hombre es del 85% o más de una dosis administrada en base a una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa; y que es de disolución rápida cuando no menos del 85% de la cantidad marcada del fármaco se disuelve dentro de 30 minutos de acuerdo a las condiciones indicadas en la Farmacopea estadounidense (United States Pharmacopeia, USP), (WHO, 2005; European Medicines Agency, EMEA, 2010; FDA, 2015).

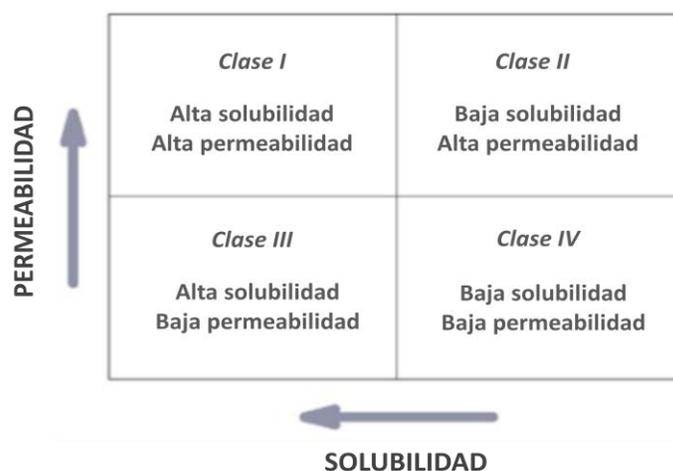


FIGURA 7. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. (Modificado de Dahan *et al.*, 2009).

El desarrollo del SCB y su amplia aceptación han sido pasos importantes en la ciencia farmacéutica que contribuyen en el descubrimiento, desarrollo y regulación de medicamentos. (Dahan *et al.*, 2009; Lennernäs, 2014; Shah y Amidon, 2014). Sus objetivos principales son la reducción de tiempo, esfuerzo y costos, al disminuir el número de estudios de bioequivalencia *in vivo* necesarios (Lennernäs, 2014). Actualmente, ha sido aprobada por la FDA como una guía para predecir la absorción de fármacos candidatos en los seres humanos.

1.12 Modelos experimentales para estudiar la permeabilidad

Los modelos de permeación pueden clasificarse en métodos *in silico*, *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas pues se pueden controlar distintas condiciones fisiológicas. Su elección depende de la etapa de desarrollo



del fármaco y de las cuestiones que necesiten responderse en el momento. Ninguno puede proporcionar datos suficientes como un método independiente, por lo que el uso de uno o más modelos pueden ser útiles para reducir el tiempo y uso de recursos durante el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (Herrera *et al.*, 2012; Balimane *et al.*, 2000; Hellinger y Vastag, 2011). A continuación se describen de manera muy breve las características de cada modelo y en la tabla **Tabla 2** se detallan algunas de las técnicas utilizadas.

In silico: Predicen con precisión la permeabilidad en base a las propiedades fisicoquímicas de la molécula (lipofilia, puentes de hidrógeno, propiedades de la superficie molecular, solubilidad, energía de solvatación, tamaño molecular). Son modelos de alto rendimiento que utilizan técnicas rentables pues requieren del uso mínimo de recursos y de personal, se utilizan por lo general para el cribado o depuración de bibliotecas virtuales, es decir, para la selección de alguna característica de interés en un conjunto en el que se presentan muchas otras características) (Galván, 2009).

In vivo: A pesar de que consumen muchos recursos, pueden ser considerados tal vez como los mejores modelos para predecir la absorción de fármacos debido a que integran todos los factores biológicos que pueden afectar a la absorción del fármaco, tales como la capa de mucosa, los componentes dinámicos de la circulación de sangre mesentérica y otros factores que pueden influir en la disolución del fármaco.

In vitro: Son técnicas más rentables en comparación con los modelos *in vivo*, sin embargo el efecto de los factores fisiológicos como la tasa de vaciamiento gástrico, la tasa de tránsito intestinal, el pH gastrointestinal, etc., no pueden incorporarse en la interpretación de datos. Su aplicación exitosa depende de en qué medida el modelo incorpore las características relevantes de la barrera biológica *in vivo*.

In situ: Los experimentos *in situ* implican la perfusión de fármacos a través de segmentos intestinales canulados aislados. Su mayor ventaja en comparación con

Tabla 2.

Modelos para evaluar la absorción intestinal

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
In silico	<i>Algoritmos matemáticos.</i> Emplea métodos computacionales basados en propiedades fisicoquímicas. Son utilizados por lo general para el cribado de bibliotecas virtuales. Modelo de alto rendimiento y rentable, el uso de recursos y personal es mínimo, sin embargo, su mayor impedimento es la falta de una base de datos suficientemente grande con información fiable. Los datos que proporciona no son tan confiables como los datos experimentales reales.
In vivo	<i>Animales y Humanos.</i> Describe una absorción completa. Proporciona poca información acerca de los mecanismos de absorción del fármaco y sin embargo, requiere de cantidades relativamente grandes de material, complejos métodos analíticos para el análisis de plasma, consumo de tiempo, intenso trabajo para los experimentos. Los resultados obtenidos es este tipo de estudios puede no ser exacta por el número tan limitado de muestras (1-2 horas después de la administración).
In vitro	<p><i>Log P.</i> Utilizado para expresar la lipofilia (o hidrofobicidad) de moléculas orgánicas en el pH del plasma sanguíneo. El perfil de lipofilia se correlaciona con el medio ambiente cambiante del pH del tracto gastrointestinal. Técnica utilizada por su simplicidad, rentabilidad, alto rendimiento y fiabilidad. Únicamente describe paso transcelular.</p> <p><i>Membranas Artificiales Inmovilizadas (MAI).</i> Utiliza como fase estacionaria una monocapa de compuestos análogos de fosfolípidos unidos covalentemente a la superficie de partículas de sílice. Los fármacos se clasifican en base al tiempo de retención. Método fácil de usar, preciso, rentable y eficiente. Requiere cantidades pequeñas de compuesto (<1 mg), no necesariamente puros. Describe únicamente paso transcelular y muestra correlación con permeabilidad a través de monocapas de Caco-2.</p> <p><i>Ensayo de Permeación con Membranas Artificiales en Paralelo (PAMPA).</i> Se realiza en placas de múltiples pocillos de dos compartimentos. El compartimento superior contiene una membrana lipídica artificial impregnada con una mezcla de lecitina-fosfolípidos disueltos en un disolvente orgánico inerte. La aparición del fármaco en los pocillos de fondo refleja la difusión del fármaco a través de la capa de lípidos. Requiere de compuestos con el menor número de impurezas. Describe sólo paso transcelular. Muestra buena correlación con permeabilidad en Caco-2 y absorción humana, a un costo menor y mayor rendimiento.</p> <p><i>Líneas celulares MDCK-II y Caco-2.</i> Permeación transcelular, paracelular y transportadores activos y de eflujo. Uso fácil, buen mezclado, transporte direccional, células animales y humanas, grosor de uniones estrechas más grande, velocidad aparente.</p> <p><i>Intestino invertido.</i> Todo el intestino delgado, o segmentos de él, se canulan en ambos extremos. Se colocan en un aparato de perfusión con medio oxigenado que contiene el compuesto de ensayo. La tasa de absorción del compuesto puede calcularse a partir de las concentraciones de fármaco en el lado luminal. Su rendimiento y complejidad son comparables con el uso de animales enteros. Técnica de bajo costo, relativamente simple, reproducible y útil en el examen de la absorción intestinal de un sitio específico; describe el transporte direccional y es útil para estudiar el efecto de la P-gp. Sin embargo, la falta de suministro de sangre y nervios activos puede conducir a una rápida pérdida de viabilidad, su integridad es <30 minutos. Presenta malas condiciones de mezclado.</p>
In situ	<i>Perfusión.</i> La absorción y permeabilidad se calculan en base a la desaparición del fármaco en el lumen intestinal y la diferencia en la concentración de fármaco en los flujos de entrada y salida, respectivamente. Describe el transporte direccional y metabolismo. Presenta buen mezclado y oxigenación. El método está limitado debido a su factor de costo, pues requiere de un gran número de animales para obtener datos de absorción estadísticamente significativos y de cantidades relativamente altas de compuestos de ensayo (>10 mg).

P-gp: glicoproteína P (Basado en Balimane *et al.*, 2000; Hellinger y Vastag, 2011; Herrera *et al.*, 2012; Guo y Shen, 2004, y Kerns, 2001.



las técnicas *in vitro* es la presencia de un suministro sanguíneo y nervioso intacto en los animales de experimentación. La entrada del compuesto puede estar estrechamente controlada con respecto a la concentración, el pH, la región intestinal, etc. Esta metodología se considera altamente precisa para predicción de la permeabilidad de compuestos transportados pasivamente.

1.13 Uso de cultivos celulares

El conflicto irreconciliable que existe entre las pretensiones de la ciencia y la medicina, y las de humanidad en el tratamiento de animales ha generado la necesidad de emplear nuevos modelos en la investigación científica.

El uso de cultivos celulares para la evaluación de la absorción de nuevos fármacos representa una excelente alternativa, pues a pesar de que los estudios en animales son más completos debido a que tienen la capacidad de evaluar la manera en que componentes fisiológicos pueden afectar las propiedades de disolución, precipitación, degradación química y/o bacteriana y metabolismo del fármaco (Herrera *et al.*, 2012), los cultivos celulares ofrecen un nivel de control no disponible con el uso de animales vivos, además de tener como principal ventaja la consistencia y reproducibilidad en los resultados que brinda (The College of Physicians of Philadelphia, s.f.; Butler, 2005).

La **Tabla 3** resume, de manera general, las principales ventajas del uso de cultivos celulares en la investigación científica.

Actualmente, la FDA aprueba el uso de monocapas celulares para la determinación de la permeabilidad de sustancias medicamentosas. Así mismo, recomienda el uso de estándares de permeabilidad para establecer la aptitud del método a utilizar, sugiriendo una lista de 20 fármacos modelo, entre los que se encuentran el clorhidrato de propranolol (alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (baja permeabilidad) utilizados en el presente trabajo (FDA, 2000).

Específicamente, con lo que respecta a los estudios de absorción, la capa de células epiteliales es la barrera más importante para la absorción de fármacos. Por lo tanto, es de esperarse que los sistemas basados en monocapas de células



epiteliales constituyan el mejor modelo *in vitro* para el estudio de la permeabilidad (Artursson y Karlsson, 1991; Hellinger y Vastag, 2011).

Tabla 3.

Principales ventajas del uso de cultivos celulares en la investigación científica (Basado en Castaño, 2000).

Control preciso y fino del medio ambiente:

Ambiente fisicoquímico y fisiológico. Control de pH, temperatura, presión osmótica, nivel de O₂, CO₂, tensión superficial, control de hormonas, concentración de nutrientes, factores de crecimiento, densidad celular.

Homogeneidad del sustrato celular:

Las células establecidas en cultivo son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, contrario a la situación con animales de experimentación. Las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones o de forma indefinida si la línea celular se conserva en nitrógeno líquido.

Réplicas y variabilidad:

Fácil cuantificación y análisis estadístico mínimo.

Ahorro de reactivos y disminución de costos:

Se emplean disoluciones con una concentración mucho menor que en el caso del animal completo. Además, se garantiza el acceso directo de la sustancia a las células sin que se diluya y sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica. El costo de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de pruebas. También se reducen los costos relacionados con la fabricación del posible nuevo fármaco: en lugar de fabricar cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) basta con que se sinteticen unos pocos miligramos.

Ahorro de tiempo:

El tiempo de ensayo se reduce al menos en un orden de magnitud.

Motivaciones éticas:

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre el ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

En comparación con otros modelos como los que utilizan membranas artificiales, los sistemas basados en células se asemejan más a las condiciones *in vivo*. La mayoría de estos modelos intestinales se obtienen de líneas de células inmortalizadas que derivan de células normales y de tumores inducidos de cáncer de colon humano, tales como Caco-2, HT-29, T-84 y MDCK (Herrera *et al.*, 2012; Hellinger y Vastag, 2011). Estas células cuando se cultivan en soportes semipermeables bajo condiciones controladas, forman monocapas que presentan un comportamiento polarizado que permite simular las condiciones del intestino.



Dependiendo del tipo y la diferenciación de las monocapas estos modelos muestran características de transporte pasivo y activo. Una de sus características importantes es que tanto el lado apical como el basolateral son de fácil acceso, lo que hace de este un excelente sistema para estudiar mecanismos de eflujo. Así también, a diferencia de los modelos animales *in vivo* utiliza pequeñas cantidades de compuestos de ensayo y no requiere de sujetos animales de prueba, lo que simplifica la interpretación de resultados al carecer de la complejidad y variabilidad encontrada en los modelos donde se trabaja con tejidos (Artursson, 1990; Herrera *et al.*, 2012; Hellinger y Vastag, 2011; Hu *et al.*, 2004; Tavelin *et al.*, 2002).

El modelo basado en la línea celular Caco-2, es el más utilizado debido a que por su origen humano presenta similitudes morfológicas y funcionales de los enterocitos intestinales (Hu *et al.*, 2004; Tavelin *et al.*, 2002). Sin embargo, otras líneas celulares como MDCK, a pesar de no ser de origen humano muestran una buena correlación con la absorción humana y la permeabilidad en Caco-2 (Hellinger y Vastag, 2011).

1.14 Madin Darby Canine Kidney (MDCK)

La línea celular MDCK fue originalmente aislada en 1958 por S. H. Madin y N. B. Darby, a partir del riñón de un perro adulto, aparentemente normal, de raza Cocker Spaniel (Mancipe *et al.*, 2011). Es quizá una de las líneas de células epiteliales mejor estudiadas en cuanto a su genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros (Braun *et al.*, 2000). Se diferencian de forma espontánea en células epiteliales columnares y forman uniones estrechas cuando se cultivan en membranas semipermeables (Hellinger y Vastag, 2011); tienen una baja actividad metabólica y expresión de proteínas de transporte. La línea celular presenta dos subclones: MDCK tipo I y tipo II, siendo el tipo II el que se utiliza para los estudios de transporte (**Figura 8**), (Cho *et al.*, 1989). Así mismo, existe una variante de esta línea celular, las MDCK-MDR1, originadas a partir de la transfección de células MDCK con el gen MDCR1, el gen que codifica para la proteína de eflujo, P-gp (Pastan *et al.*, 1988).



Debido a su origen, las células MDCK expresan transportadores que son extremadamente diferentes de los del intestino humano, lo que podría limitar su empleo para predecir la absorción intestinal humana (Hellinger y Vastag, 2011; Balimane *et al.*, 2000). Sin embargo, Irvine y colaboradores (1999) demostraron que son un modelo útil en el estudio de mecanismos de transporte epitelial pasivo, al concluir que la permeabilidad obtenida con células MDCK correlaciona bien con la absorción humana (como con la permeabilidad determinada en células Caco-2).

Finalmente, una de las principales ventajas de las células MDCK con respecto a la línea celular Caco-2 es el período de cultivo más corto (3 días frente a 3 semanas), lo que significa una reducción de trabajo y menor tiempo de manipulación, evitando de este modo una posible contaminación celular (Balimane *et al.*, 2000, Hellinger y Vastag, 2011).

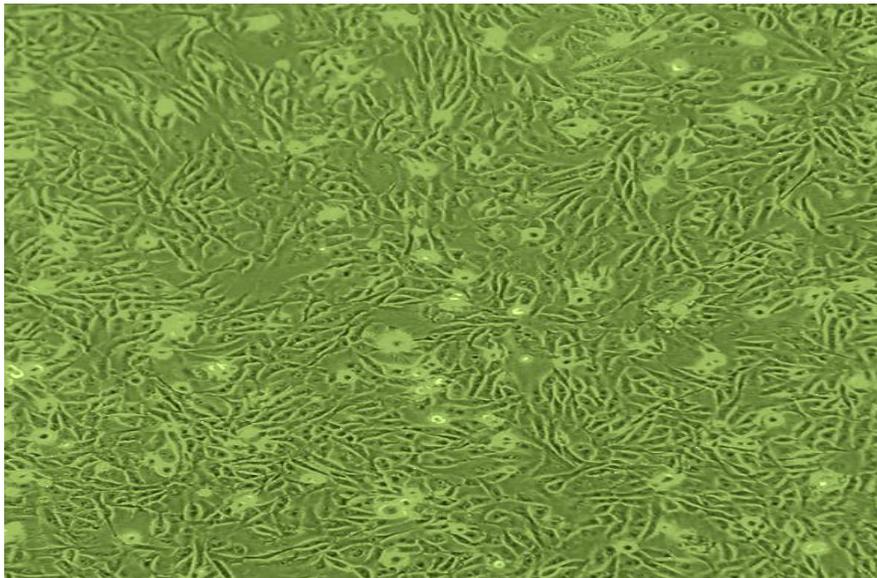


FIGURA 8. Células MDCK tipo II. Células renales de un perro adulto de raza Cocker Spaniel, aisladas en 1958 por S. H. Madin y N. B. Darby. Se diferencian de forma espontánea en células epiteliales columnares y forman uniones estrechas cuando se cultivan en membranas semipermeables. Presentan una baja actividad metabólica y baja expresión de proteínas de transporte.



2. HIPÓTESIS

En base a las propiedades fisicoquímicas de la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (peso molecular de 462 g/mol y coeficiente de partición de 3.35), se espera que su paso a través de la monocapa de células epiteliales de MDCK que simulan a la capa de células epiteliales de la mucosa intestinal y cuya permeabilidad correlaciona positivamente con la absorción humana, se realice mediante un transporte por difusión pasiva aparente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la permeabilidad aparente de la 4-fenilcumarina a través de la línea celular MDCK.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Evaluar la citotoxicidad del fitofármaco en la línea celular MDCK, a fin de esclarecer la viabilidad del uso de determinadas concentraciones del compuesto en los estudios de permeabilidad.
- ◆ Optimizar la técnica de estudios de permeabilidad *in vitro* utilizando cultivos celulares de la línea celular MDCK.
- ◆ Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente (Paap) de la 4-fenilcumarina, en sentido apical-basolateral (AP-BS) y basolateral-apical (BS-AP) para dilucidar acerca de la permeabilidad y el tipo de transporte que está favoreciendo el paso del fitofármaco a través de la membrana intestinal.



4. METODOLOGÍA

4.1. Material y Equipo

- ◆ Cajas de cultivo de 25 y 75 cm² *Corning*
- ◆ Placas de 96 pozos tipo ELISA estériles *Costar*
- ◆ Soportes permeables Transwell®-COL estériles *Corning* (12 insertos de 12 mm de diámetro, membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) recubierta con colágeno, 0.4 µm de tamaño de poro y 1.12 cm² de área superficial de crecimiento)
- ◆ Campana de flujo laminar, Clase II, Tipo A2, *Nuaire, Modelo UN-425-300*
- ◆ Centrífuga *Hettich, Modelo TYP 1706-01*
- ◆ Incubadora *Shel-Lab, Modelo 3552*
- ◆ Microscopio Óptico *Olympus, Modelo CKX41*
- ◆ Agitador oscilatorio *Boekel Scientific*
- ◆ Lector de ELISA *Daigger, Modelo ELX800GDGR*
- ◆ Balanza analítica *Sartorius A9, Modelo A210P*
- ◆ Potenciómetro *Thermo Scientific Orion*
- ◆ Sonicador *Branson, Modelo 3510R-MTH*
- ◆ Voltímetro epitelial *EVOM2* (electrodo STX2)
- ◆ Fluorómetro *BioTek Synergy HT*
- ◆ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) *Agilent 1100* con:
Detector *Modelo G1315B*, Termostato *Modelo G1316A*, Desgasificador *Modelo G1322A*, Bomba *Modelo G1311A* y Sistema de inyección *Modelo G1313A*.
- ◆ Columna cromatográfica *Symmetry C18*; 4.6 x 150mm; 5µm
- ◆ Columna cromatográfica *Agilent Zorbax SB-C18*; 4.6x150mm; 3.5µm
- ◆ Columna cromatográfica *Agilent Zorbax Eclipse Plus SB-C18*; 4.6x150mm; 3.5µm



4.2 Material Biológico

◆ Línea celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK)

Se utilizó la línea celular MDCK de epitelio renal de perro donada por la Dra. Lilián Yépez Mulia de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Las células mantenidas a -70°C con suero fetal bovino (SFB) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) se descongelaron y cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales (Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, ácido L-Aspártico, ácido L-Glutámico, L-Prolina y L-Serina) y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa (HR). Los materiales utilizados fueron obtenidos de Gibco®.

4.3 Compuesto evaluado

◆ 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

El compuesto empleado fue extraído y donado por la Dra. Rachel Mata Essayag del laboratorio 123 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

4.4 Preparación de soluciones

4.4.1 Cultivo y Proliferación Celular

Etanol al 70%. Para preparar 1L de solución, se midieron con una probeta 700 ml de alcohol etílico absoluto (J.T.Baker) y se llevó a un volumen final con agua desionizada.

Medio de cultivo DMEM suplementado. Bajo condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó a un frasco de medio de cultivo DMEM (Gibco), el equivalente al 10% del volumen total de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos, se agitó hasta homogenizar perfectamente.



Medio de lavado Ham F-12. Para preparar 1L de medio de lavado se disolvió en 950 ml de agua destilada el contenido de un sobre de Ham F-12 (Gibco), se añadieron 1.176 g de NaHCO_3 , se mezcló perfectamente y se agregó el agua restante hasta obtener el volumen final. El pH fue ajustado por debajo de 0.2-0.3 del pH final de trabajo, utilizando NaOH 1N o HCl 1N. Finalmente el líquido se esterilizó mediante filtración con membrana.

4.4.2 Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular

Ácido acético al 1%. Para preparar 500 ml de solución, se colocó en un matraz Erlenmeyer una pequeña porción de agua destilada, posteriormente se agregaron 5 ml de ácido acético glacial (J.T.Baker), se homogenizó, y se llevó a volumen final con agua destilada.

Solución Tris Base 10 mM (pH 10.5). Se pesaron 1.2100 g de Tris Base que fueron transferidos a un matraz volumétrico de 1 L para disolverlos con agua destilada, antes de aforar se ajustó el pH a 10.5 utilizando soluciones de NaOH 1N o HCl 1N. Se llevó a volumen final con agua destilada.

Ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). Se pesaron 10 g de ácido tricloroacético que fueron disueltos en 100 ml de agua destilada.

Sulforrodamina B (SRB) al 0.4 %. Se disolvió exactamente 1 g de Sulforrodamina B (Aldrich Chemistry) en 250 ml de ácido acético al 1%.

Solución stock de cis-platino 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se pesaron 0.0010 g de cis-platino (Alfa Aesar) y se disolvieron perfectamente en 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T.Baker).

Solución de cis-platino 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Solución A). Se tomó una alícuota de 20 μl de la Solución Stock de cis-platino (5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada.



Solución de cis-platino 10 µg/ml (Solución B). Se tomó una alícuota de 100 µl de la Solución A de cis-platino y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada.

Solución de cis-platino 1 µg/ml (Solución C). Se tomó una alícuota de 100 µl de la Solución B de cis-platino y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada.

Solución de cis-platino 0.1 µg/ml (Solución D). Se tomó una alícuota de 100 µl de la Solución C de cis-platino y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada.

Solución de stock de 4-fenilcumarina 1000 µg/ml (Solución E). Se pesaron 0.0100 g de 4-fenilcumarina, los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 10 ml, se agregó 1 ml de metanol y un poco de agua destilada, se agitó vigorosamente y se colocó en el baño de ultrasonido el tiempo necesario hasta que se observó una solución homogénea, finalmente se llevó al aforo con agua destilada.

Solución de 4-fenilcumarina 100 µg/ml (Solución F). Se tomó una alícuota de 1 ml de la Solución E y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua destilada.

Solución de 4-fenilcumarina 10 µg/mL (Solución G). Se tomó una alícuota de 1 ml de la Solución F y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua destilada.

Solución de 4-fenilcumarina 1 µg/mL (Solución H). Se tomó una alícuota de 1 ml de la Solución G y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua destilada.

4.4.3 Ensayos de Permeabilidad

Solución amortiguadora de Hank adicionada con glucosa 10mM y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) 10mM (Medio de transporte estéril). Para preparar 1L de solución, se pesaron 9.81 g de la sal de Hank (NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, rojo fenol) (MP Biomedicals, LLC), se añadieron 2.6029 g de HEPES (J.T.Baker) y se disolvió con agua desionizada, se adicionaron 36 ml de solución de glucosa al 5% (DELMEX-SIX) y se agitó hasta obtener una solución homogénea. Antes de aforar el pH fue ajustado a 7.45 ± 0.1 con solución de NaOH 1N o solución de HCl 1N. Finalmente se llevó a volumen



final con agua desionizada. La solución fue esterilizada dentro de la campana de flujo laminar mediante filtración.

Solución stock de 4-fenilcumarina 100 µg/ml. Se pesaron 0.0010 g de 4-fenilcumarina, los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 10 ml, se agregaron aproximadamente 5 ml de solución amortiguadora de Hank y se colocó en el baño de ultrasonido el tiempo necesario hasta que se observó una solución homogénea, finalmente se llevó al aforo con la misma solución amortiguadora.

Solución de trabajo de 4-fenilcumarina 16 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1.6 ml de la solución stock de 4-fenilcumarina (100 µg/ml) y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de 4-fenilcumarina 8 µg/ml. Se tomó una alícuota de 800 µl de la solución stock de 4-fenilcumarina (100 µg/ml) y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de 4-fenilcumarina 4 µg/ml. Se tomó una alícuota de 400 µl de la solución stock de 4-fenilcumarina (100 µg/ml) y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución Stock de clorhidrato de propranolol 1000 µg/ml. Se pesó con exactitud el equivalente a 0.0100 g de clorhidrato de propranolol (Estándar de Referencia, USP), se disolvió y se aforó a 10 ml con metanol.

Solución de trabajo de clorhidrato de propranolol 100 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución stock de clorhidrato de propranolol (1000 µg/ml) y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de clorhidrato de propranolol 16 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1.6 ml de la solución de trabajo de clorhidrato de propranolol de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.



Solución de trabajo de clorhidrato de propranolol 8 µg/ml. Se tomó una alícuota de 800 µl de la solución de trabajo de clorhidrato de propranolol de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de clorhidrato de propranolol 4 µg/ml. Se tomó una alícuota de 400 µl de la solución de trabajo de clorhidrato de propranolol de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución Stock de clorhidrato de ranitidina 1000 µg/ml. Se pesó con exactitud el equivalente a 0.0100 g de clorhidrato de ranitidina (Sustancia de Referencia, FEUM, 99.6%), se disolvió y se aforó a 10 ml con metanol.

Solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina 100 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución stock de clorhidrato de ranitidina (1000 µg/ml) y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina 16 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1.6 ml de la solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina 8 µg/ml. Se tomó una alícuota de 800 µl de la solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina 4 µg/ml. Se tomó una alícuota de 400 µl de la solución de trabajo de clorhidrato de ranitidina de 100 µg/ml y se llevó a un volumen final de 10 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución de Lucifer Yellow 100 µg/ml. Se pesó con exactitud 0.0020 g de Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich) y se llevó a un volumen final de 20 ml con solución amortiguadora de Hank.



4.4.4 Método Bioanalítico

Metanol grado HPLC. Se transfirió metanol (J.T.Baker) en un frasco contenedor para fase móvil de 1L, posteriormente se filtró al vacío utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , finalmente se colocó en un baño de ultrasonido durante 25 minutos para desgasificarlo.

Agua acidificada con Ácido trifluoroacético (ATF) 0.1%. Se colocaron 999 ml de agua grado HPLC Milli-Q en una probeta y se adicionó 1 ml de ATF (Aldrich). La mezcla se filtró al vacío utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm y antes de ser utilizada se colocó en un baño de ultrasonido por 25 minutos.

Solución stock de 4-fenilcumarina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se pesaron 0.0100 g de 4-fenilcumarina, los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron aproximadamente 50 ml de solución amortiguadora de Hank y se colocó en un baño de ultrasonido el tiempo necesario hasta que se observó una solución homogénea, finalmente se llevó al aforo con la misma solución amortiguadora.

Curva de calibración de 4-fenilcumarina. Para las soluciones de la curva de calibración se tomaron diferentes alícuotas de la solución stock (**Tabla 4**), llevando a un volumen final de 25 ml con solución amortiguadora de Hank.

Verificación del sistema. Antes de cada corrida analítica se comprobó la idoneidad del sistema, para lo cual se utilizó una solución de 4-fenilcumarina de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Tabla 4**), que fue inyectada por lo menos seis veces consecutivas, al iniciar la corrida.

Muestras Control. Se utilizaron 3 niveles de concentración diferentes, independientes a las muestras de la curva de calibración: muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM) y muestra control alta (MCA), las cuales fueron preparados a partir de la solución stock de 4-fenilcumarina. Las alícuotas utilizadas se encuentran en la **Tabla 4**.



Tabla 4. Preparación de la curva de calibración de 4-fenilcumarina

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Alícuota de la Solución Stock de $100 \mu\text{g/ml}$ (ml)	Aforo (ml)
0.5	0.125	25.0
1.0	0.250	25.0
2.5	0.625	25.0
5.0	1.25	25.0
10.0	2.5	25.0
20.0	5.0	25.0
40.0	10.0	25.0
2.0 (MCB)	0.5	25.0
8.0 (MCM)	2.0	25.0
25.0 (MCA)	6.25	25.0
5.0 (Verificación del sistema)	1.25	25.0

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 1 M. Se pesaron 1.3799 g de fosfato monobásico de sodio (J.T.Baker), los cuales se transfirieron a un matraz aforado 10 ml y se llevó a un volumen final con agua desionizada.

Solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.5 M. Se pesaron 7.098 g de fosfato monobásico de sodio, los cuales se transfirieron a un matraz aforado 100 ml y se llevó a un volumen final con agua desionizada.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6). Para preparar 1L de solución se mezclaron 5.2 ml de solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 1 M y 63.2 ml de solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.5 M, se ajustó el pH a 7.6 con soluciones de H_3PO_4 o NaOH diluidos y se llevó a un volumen final con agua desionizada. Finalmente la solución fue filtrada al vacío



utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm y colocada en un baño de ultrasonido por 25 minutos antes de ser utilizada.

Solución stock de clorhidrato de propranolol 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se pesó con exactitud el equivalente a 0.0100 g de clorhidrato de propranolol, los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron aproximadamente 50 ml de solución amortiguadora de Hank y se colocaron en un baño de ultrasonido el tiempo necesario hasta que se observó una solución homogénea, finalmente se llevó al aforo con la misma solución amortiguadora.

Curva de calibración de clorhidrato de propranolol. Para preparar las soluciones de la curva de calibración se tomaron diferentes alícuotas de la solución stock (**Tabla 5**), llevando a un volumen final de 5 ml con solución amortiguadora de Hank.

Solución Stock de clorhidrato de ranitidina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se pesó con exactitud el equivalente a 0.0100 g de clorhidrato de ranitidina, los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml, se agregaron aproximadamente 50 ml de solución amortiguadora de Hank y se colocaron en un baño de ultrasonido el tiempo necesario hasta que se observó una solución homogénea, finalmente se llevó al aforo con la misma solución amortiguadora.

Curva de calibración de clorhidrato de ranitidina. Para preparar las soluciones de la curva de calibración se tomaron diferentes alícuotas de la solución stock (**Tabla 5**), llevando a un volumen final de 5 ml con solución amortiguadora de Hank.

Verificación del sistema. Para cada uno de los estándares antes de iniciar el análisis de las muestras se comprobó la idoneidad del sistema, para lo cual se utilizó una solución de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Tabla 5**), que fueron inyectadas por lo menos seis veces consecutivas, al iniciar la corrida respectiva.

Muestras Control. Para cada estándar se utilizaron 3 niveles de concentración diferentes, independientes a las muestras de la curva de calibración: muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM) y muestra control alta (MCA),



las cuales fueron preparados a partir de la solución stock correspondiente. Las alícuotas utilizadas se encuentran en la **Tabla 5**.

Tabla 5.

Preparación de curvas de calibración de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina

Aforo (ml)	Clorhidrato de propranolol		Clorhidrato de ranitidina	
	Concentración (µg/ml)	Alícuota de Solución Stock de 100 µg/ml (µl)	Concentración (µg/ml)	Alícuota de Solución Stock de 100 µg/ml (µl)
5.0	0.5	25	0.5	25
5.0	1.0	50	4.0	200
5.0	5.0	250	6.0	300
5.0	8.0	400	8.0	400
5.0	10.0	500	10.0	500
5.0	15.0	750	18.0	900
5.0	20.0	1000	-----	-----
5.0	2.0 (MCB)	100	1.0 (MCB)	50
5.0	9.0 (MCM)	450	9.0 (MCM)	450
5.0	19.0 (MCA)	950	17.0 (MCA)	850
5.00	8.0 (Verificación del sistema)	400	8.0 (Verificación del sistema)	400

4.5 Procedimiento Experimental

4.5.1 Cultivo Celular

◆ Descongelamiento de la Línea Celular

Una vez que se retiró del banco celular el criotubo que contenía a las células conservadas a -70°C en SFB y 10% de DMSO, se realizó el descongelamiento de las mismas frotando suavemente con las manos el criotubo hasta obtener una



suspensión. En condiciones asépticas, se vertió completamente la suspensión celular descongelada en un volumen de 10 ml de medio de lavado Ham F-12, se homogenizó la solución formada y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos.

◆ Proliferación celular

Para iniciar con la proliferación de las células, se determinó la viabilidad celular en una cámara de Neubauer con azul tripano (Gibco) en una concentración 1:5, una vez obtenida la viabilidad, en cajas de 25 cm² se sembró por duplicado una alícuota de 500,000 células por ml de la suspensión celular en 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado, se homogenizó la solución y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de HR por una hora. Trascurrido el tiempo de incubación se observó al microscopio y se verificó que las células estuvieran adheridas a la superficie de la caja de cultivo. Finalmente se cambió el medio a las cajas para retirar las células no viables y se dejó incubando a las mismas condiciones. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 48 horas hasta obtener una confluencia del 80% aproximadamente, la cual se determinó de manera cualitativa mediante la observación al microscopio del área de crecimiento de las cajas de cultivo.

Una vez alcanzada dicha confluencia se procedió a cosechar las células retirando completamente el medio de cultivo y agregando 1 ml de Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco), se incubó a 37°C, 5% CO₂ y 95% de HR de 3 a 5 minutos para desprenderlas de la superficie de la caja, posteriormente para detener la acción de la tripsina se agregó medio de lavado Ham F-12 y la solución se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el botón formado se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado. Se realizaron 3 pases para poder iniciar con los ensayos de inhibición de la proliferación y/o con los estudios de permeabilidad.



◆ **Determinación de la concentración celular**

En un microtubo se colocaron 80 μl de azul tripano y se adicionaron 20 μl de la suspensión celular, se mezclaron perfectamente y se colocaron 15 μl de esta mezcla en la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio con el objetivo de 10x y se contó a las células no teñidas por mm^2 en los cuatro cuadrantes de la cámara. Se calculó el número promedio de células no teñidas en los cuatro cuadrantes y se determinó la concentración celular (número de células por ml de suspensión) de la siguiente manera:

$$\text{CONCENTRACIÓN (Cél/ml)} = N \times Fd \times Fc$$

Donde, N es el número promedio de células no teñidas, Fd el factor de dilución (5) y Fc el factor de conversión de la cámara (10,000).

4.5.2 Ensayos de inhibición de la proliferación celular (citotoxicidad)

Para evaluar la citotoxicidad se utilizó el método colorimétrico de Sulforrodamia B (SRB) en placas de 96 pozos tipo ELISA estériles las cuales se dividieron en cuadrantes probando concentraciones logarítmicas que fueron de 0.1, 1.0, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ para la 4-fenilcumarina y de 0.01, 0.1, 1.0 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para el control positivo (cis-platino). En condiciones asépticas se sembraron 20,000 células por pozo en un volumen total de 100 μl de medio DMEM suplementado y se incubó a 37°C, 5% CO_2 y 95% de HR durante 24 horas para permitir la adhesión de las células a la superficie del pozo.

Se prepararon las soluciones de 4-fenilcumarina y del control positivo de acuerdo a lo indicado en la sección de preparación de soluciones (Soluciones de la A a la H)¹. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró cuidadosamente el medio a cada pozo y se les adicionó 90 μl de medio de cultivo fresco y 10 μl de la

¹ Las soluciones se prepararon 10 veces más concentradas para que al momento de diluirlas las concentraciones reales en los pozo fueran de 100.0, 10.0, 1.0, 0.10 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.



solución a evaluar. A los pozos que se emplearon como blancos de referencia de proliferación (sin tratamiento) se les agregó únicamente 100 μ l de medio de cultivo DMEM suplementado, a fin de asegurar la viabilidad celular. La evaluación de las soluciones se hizo por sextuplicado como se indica en la **Figura 9**. El periodo de tratamiento fue de 24 horas a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de HR (el CO₂ en la atmósfera de la incubadora permitió mantener el pH constante adecuado para el crecimiento de las células, mientras que la alta humedad evitó la evaporación del medio del cultivo).

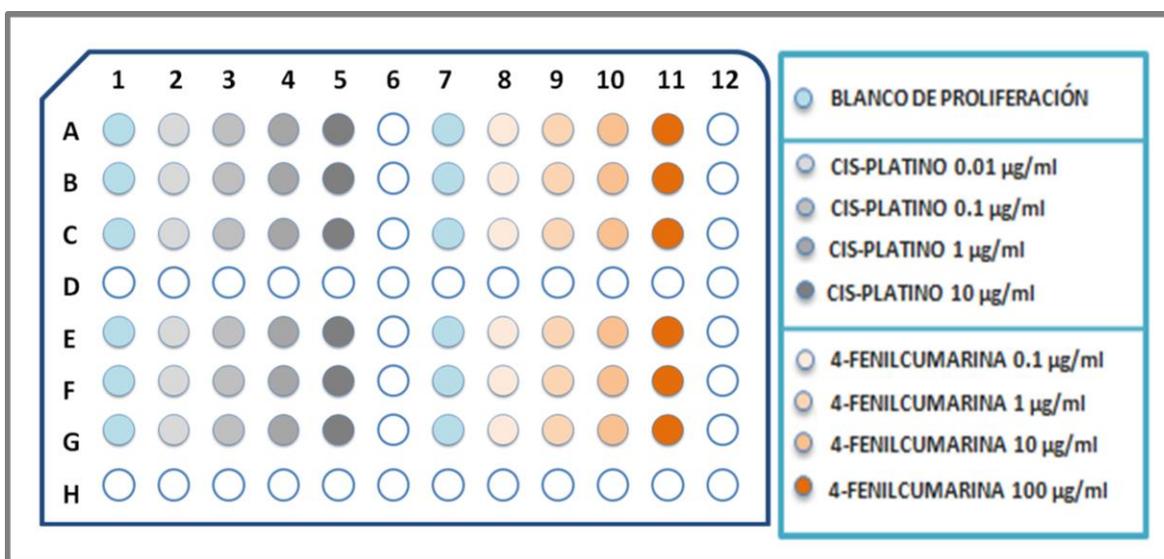


FIGURA 9. Ensayos de inhibición de la proliferación celular. Placa de 96 pozos tipo ELISA con la distribución de las soluciones de 4-fenilcumarina evaluadas por sextuplicado, utilizando cisplatino como control positivo. Para los blancos de referencia de proliferación se utilizó únicamente medio de cultivo DMEM suplementado. El periodo de tratamiento fue de 24 horas, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de HR.

Cumplido el tiempo de tratamiento se aspiró el medio con una bomba de vacío y se fijaron las células con 100 μ l de solución de TCA al 10%, se incubó durante 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo, se desechó el TCA y se lavó con agua hasta retirar el exceso de ácido, se dejaron secar completamente las placas a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez secas, las células se tiñeron con 50 μ l de solución de SRB al 0,4 % en ácido acético, incubando por 30 minutos a



temperatura ambiente. Terminado el tiempo de tinción se retiró el colorante y se lavó con 100 μ l de ácido acético al 1%, hasta eliminar todo el exceso de colorante dejando secar a temperatura ambiente. Por último, el colorante se disolvió con 100 μ l de solución de Tris Base 10 mM y se hizo la lectura de las placas en un lector automatizado a una longitud de onda de 564 nm.

El porcentaje de viabilidad se determinó con la siguiente fórmula, donde AP se refiere a la absorbancia del pozo con el compuesto prueba (cis-platino o 4-fenilcumaina) y AB, a la absorbancia del pozo correspondiente al blanco de proliferación (sin tratamiento), el cual se consideró como el 100% de viabilidad.

$$\% \text{ PROLIFERACIÓN CELULAR} = \frac{AP \times 100}{AB}$$

Este método colorimétrico se basa en la cuantificación de la tinción de las proteínas celulares con la SRB (Skehan *et al.*, 1990). La viabilidad o proliferación de las células se determinó mediante el grado de tinción expresado por la absorbancia de los pozos, los cuales fueron directamente proporcionales, mientras mayor fue la cantidad de células vivas mayor fue la tinción y por ende mayor la absorbancia. La citotoxicidad de los compuestos prueba se pudo apreciar mediante la disminución de la tinción y la absorbancia de los pozos.

4.5.3 Estudios de permeabilidad

Para los estudios de permeabilidad se utilizaron soportes permeables Transwell®-COL estériles de 12 insertos. El modelo consistió en colocar los insertos sobre cada pozo de la placa de poliestireno a fin de formar dos compartimentos, un compartimento superior y un compartimento inferior (simulando a la cámara apical y cámara basolateral, respectivamente), divididas por una membrana microporosa de PTFE recubierta con colágeno, el cual promovió la unión de las células y la difusión (Corning. Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide, 2010). Las células fueron inoculadas en los insertos Transwell para la formación



de la monocapa celular sobre la membrana semipermeable. La membrana ópticamente transparente permitió observar la formación de la monocapa a través del microscopio óptico (**Figura 10**).

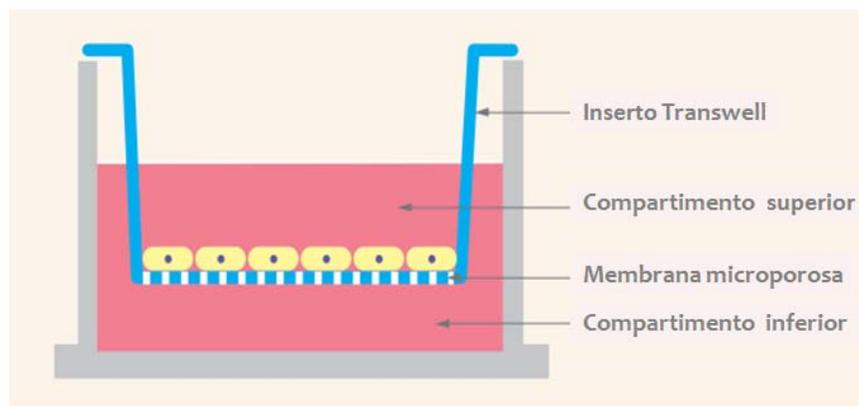


FIGURA 10. Celda Transwell. El modelo consistió en colocar un inserto Transwell sobre uno de los pozos de la placa de poliestireno, formando un compartimento superior y un compartimento inferior divididos por una membrana microporosa de PTFE. Las células fueron inoculadas en los insertos o compartimento superior para la formación de la monocapa celular sobre la membrana semipermeable. (Modificada de *Corning. Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide, 2013*).

El transporte del fitofármaco se estudió en dos direcciones, en sentido apical-basolateral (AP-BS) y basolateral-apical (BS-AP), evaluando concentraciones de 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, así mismo se utilizaron dos estándares de permeabilidad recomendados por la FDA, clorhidrato de propranolol como estándar de alta permeabilidad y clorhidrato de ranitidina como estándar de baja permeabilidad, además de un blanco sin células.

4.5.4 Preparación de la monocapa celular en Celdas Transwell

En condiciones asépticas se adicionó a la cámara AP 500 μl de medio de cultivo DMEM suplementado y 1500 μl de este mismo medio a la cámara BS, se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de HR durante 1 hora, transcurrido este tiempo se sembró el equivalente a 67,200 células en la cámara AP y se



incubó a las mismas condiciones. El medio de cultivo fue cambiado cada 24 horas hasta la formación de la monocapa celular.

4.5.5 Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER)

A los tres días de haber sembrado las células, cuando la formación de una monocapa fue visible en el microscopio óptico empleando el objetivo de 10x, se midió por triplicado la TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) empleando un voltímetro epitelial *EVOM2* (*World Precision Instruments*), para lo cual el medio de cultivo fue sustituido por solución amortiguadora de Hank estéril (pH 7.45) que simulaba al fluido intersticial, la placa se incubó a 37°C durante 15 minutos. Una vez hechas las lecturas la solución amortiguadora fue cambiada por medio de cultivo nuevamente y se incubó a las mismas condiciones para continuar con la formación de la monocapa. Se hicieron tantas mediciones como fueron necesarias hasta que la resistencia promedio se encontró en un rango de 180 a 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, lo cual indicaba que la monocapa celular se había formado y presentaba una alta cantidad de uniones celulares. La medición de la resistencia eléctrica se realizó cada 24 horas.

4.5.6 Transporte en el sentido apical-basolateral (AP-BS)

Al quinto día, cuando se tuvo el sistema con la monocapa celular formada y la presencia de una alta cantidad de uniones celulares, ambas indicadas por el valor de la TEER en el intervalo de 180 a 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 1500 μl de solución amortiguadora de Hank (pH 7.45) en la cámara BS (receptora) y 500 μl de las soluciones de trabajo del fitofármaco y los estándares de permeabilidad (4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$) en la cámara AP (donadora), posteriormente la placa se colocó en agitación orbital a 80 rpm y 37°C, se tomaron muestras de 200 μl a los 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos de la cámara BS y el volumen retirado fue sustituido con solución amortiguadora.



4.5.7 Transporte en el sentido basolateral-apical (BS-AP)

Por lo que se refiere al transporte en este sentido, se adicionaron 1500 µl de las soluciones de trabajo del fitofármaco y los estándares de permeabilidad (4, 8 y 16 µg/ml) en la cámara BS (donadora), y 500 µl de solución amortiguadora de Hank (pH 7.45) en la cámara AP (receptora), posteriormente la placa se colocó en agitación orbital a 80 rpm y 37°C, se tomaron muestras de 200 µl a los 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos de la cámara AP, el volumen retirado fue sustituido con solución amortiguadora de Hank.

Al terminar el estudio se verificó la integridad de la monocapa celular midiendo nuevamente la TEER y utilizando una solución de Lucifer Yellow.

4.5.8 Evaluación de la integridad de la monocapa celular con Lucifer Yellow

Se cambiaron las soluciones contenidas en las celdas y se adicionaron 1500 µl de solución amortiguadora de Hank atemperada a 37°C en la cámara BS y 500 µl de solución de Lucifer Yellow en la cámara AP. La placa se colocó en agitación orbital a 80 rpm y 37°C durante 2 horas. Al finalizar el ensayo, se tomó el volumen total de la cámara BS y se leyeron en un espectrofluorómetro a una longitud de excitación de 485 nm y 530 nm de emisión (Irvine *et al.*, 1999).

Las muestras obtenidas fueron cuantificadas utilizando metodologías previamente validadas, las cuales cumplen con lo dispuesto en Guías Internacionales para la Validación de Método Bioanalíticos, como la establecida por la FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* (2001) y la establecida por la ICH (International Conference on Harmonisation), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005), así como lo indicado para la validación de método analíticos para el análisis de muestras biológicas en la *NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.* Las condiciones cromatográficas de los métodos utilizados para cada analito se muestran en las **Tablas 6, 7 y 8.**



Tabla 6.

Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de 4-fenilcumarina en solución amortiguadora de Hank pH 7.45 (PNO-Validación del método de cuantificación para la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en solución de Hank, 2013)

Parámetro	Condición
Columna cromatográfica	Symmetry C18; 4.6 x 150mm; 5µm
Fase móvil	Metanol : Agua acidificada con ATF al 0.1% (50:50)
Velocidad de flujo	1.2 ml/min
Longitud de onda	328 nm
Temperatura	25°C
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de corrida	5 min
Tiempo de retención	2 min ± 0.5 min

Tabla 7.

Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de clorhidrato de propranolol en solución amortiguadora de Hank pH 7.45 (Mares, 2013).

Parámetro	Condición
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax Eclipse Plus SB-C18, 4.6x150mm, 3.5µm
Fase móvil	Metanol:Buffer fofatos 0.01M pH 7.6 (70:30)
Velocidad de flujo	0.5 ml/min
Longitud de onda	322 nm
Temperatura	Temperatura ambiente
Volumen de inyección	25 µl
Tiempo de corrida	4.5 min
Tiempo de retención	3.25 min ± 0.5 min



Tabla 8.

Condiciones cromatográficas del método de cuantificación de clorhidrato de ranitidina en solución amortiguadora de Hank pH 7.45 (Mares, 2013).

Parámetro	Condición
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax SB-C18, 4.6x150mm, 3.5µm
Fase móvil	Metanol:Buffer fosfatos 0.01M pH 7.6 (60:40)
Velocidad de flujo	1.0 ml/min
Longitud de onda	290 nm
Temperatura	Temperatura ambiente
Volumen de inyección	25 µl
Tiempo de corrida	3.5 min
Tiempo de retención	2.45 min ± 0.5 min

Finalmente, el Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) * \left(\frac{1}{C_o \cdot A} \right)$$

Donde P_{app} es el Coeficiente de permeabilidad aparente medida en cm/s, (dQ/dt) la velocidad de transporte del fármaco en µg/s, C_o la concentración inicial en la cámara donadora (µg/ml) y A el área superficial de la membrana de PTFE dada en cm².



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayos de inhibición de la proliferación celular

Antes de iniciar con los estudios de permeabilidad se determinó la citotoxicidad de la 4-fenilcumarina en la línea celular MDCK, en un rango de concentraciones de 0.1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ mediante el método colorimétrico de SRB, utilizando cis-platino como control positivo en concentraciones de 0.01 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

El método de SRB permite la determinación del punto final de la viabilidad o crecimiento celular. La SRB es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, que posee dos grupos sulfónicos $-\text{SO}_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con TCA (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

Después del periodo de tratamiento de 24 horas, los resultados obtenidos mostraron que en la línea celular el fitofármaco no causó una disminución significativa de la proliferación celular. Los porcentajes de inhibición del crecimiento oscilan entre 6 ± 1 y 11 ± 3 % ($n=6$, $\pm\text{SD}$) demostrando que a las concentraciones utilizadas no hay un efecto citotóxico significativo sobre las células, comparadas con el control positivo en las que la inhibición es evidente al presentar una inhibición del 52 ± 2 % ($n=6$, $\pm\text{SD}$) a una concentración diez veces menor que la solución evaluada más concentrada de 4-fenilcumarina (**Tabla 9**).

Al graficar los datos de inhibición de la proliferación celular con respecto a las concentraciones de 4-fenilcumarina y cis-platino se puede observar mejor el comportamiento de las células, a medida que aumentó la concentración de ambos compuestos hubo un aumento en el porcentaje de inhibición (**Figura 11**).



Tabla 9.

Porcentajes promedio (n=6) de inhibición de la proliferación de la línea celular MDCK al evaluar la acción de 4-fenilcumarina y cis-platino (control positivo), empleando el método colorimétrico de SRB.

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	4-Fenilcumarina				Cis-platino			
	0.10	1.00	10.00	100.00	0.01	0.10	1.00	10.00
Inhibición de la proliferación celular (%)	6	7	9	11	1	5	16	52
SD* (%)	± 1	± 3	± 4	± 3	± 2	± 4	± 2	± 2

*SD: Desviación estándar

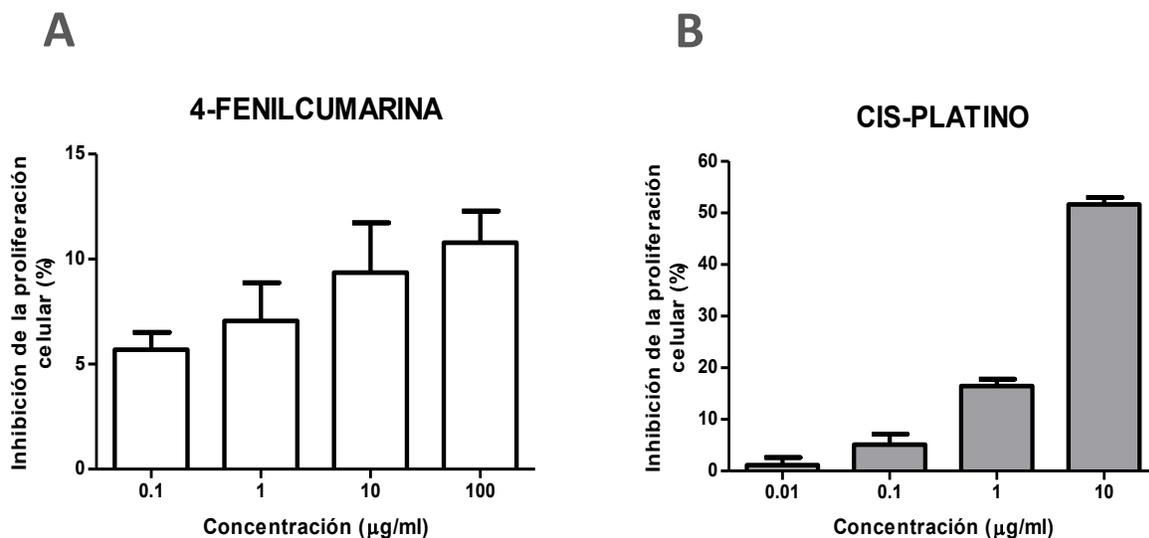


FIGURA 11. Inhibición del crecimiento celular. La disminución de la viabilidad celular de células MDCK por efecto de la 4-fenilcumarina (**A**) y cis-platino, control positivo (**B**), n=6, después de un tratamiento de 24 horas fue determinada mediante el método colorimétrico de SRB, el cual se basa en la cantidad de proteínas celulares asociadas al colorante para obtener una medida del número de células presentes. El bajo efecto citotóxico del fitofármaco se hizo evidente al rebasar apenas el 10% de inhibición de la proliferación celular a la concentración de 100µg/ml. El control positivo presentó una inhibición ligeramente superior al 50%, a una concentración diez veces menor.



Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con el objeto de evaluar el efecto que el fitofármaco podía producir sobre las células, con la finalidad primordial de esclarecer si las concentraciones a evaluar de 4-fenilcumarina en los estudios de permeabilidad producirían algún efecto tóxico, manifestado mediante la inhibición del crecimiento celular, para de este modo asegurar la viabilidad de las células y por ende la presencia e integridad de la monocapa celular durante el tiempo de ensayo. Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos no mostraron un efecto citotóxico significativo sobre las células MDCK en un amplio rango de concentración, 0.1 a 100 $\mu\text{g/ml}$, dentro del cual se encontraban las concentraciones de 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, probadas en los ensayos de permeabilidad, con lo que fue posible garantizar que era seguro trabajar a dichas concentraciones ya que las soluciones del compuesto no dañarían la monocapa celular y de este modo tendríamos la certeza de que el paso de la 4-fenilcumarina a través de la membrana semipermeable se debió a que se atravesó la barrera formada por la monocapa de células epiteliales.

Los ensayos de citotoxicidad son utilizados además para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que se refiere a la concentración de compuesto necesaria para reducir el crecimiento celular normal en un 50% en relación al número de células en controles sin tratar (Abeijón, 2009), sin embargo en el caso de la 4-fenilcumarina no fue posible llegar a tal concentración debido a su difícil solubilidad en metanol-agua.



5.2 Estudios de permeabilidad

Estudios anteriores sobre la absorción de fármacos transportados pasivamente a través de cultivos celulares han indicado que las monocapas de células MDCK pueden ser un modelo útil para estudios de permeabilidad durante el desarrollo e investigación de nuevos fármacos (Irvine *et al.*, 1999). Estos estudios se basan en la simulación de la membrana intestinal mediante la formación de una monocapa de células epiteliales sobre una membrana semipermeable de PTFE presente en el compartimento superior o cámara apical de soportes Transwell (ver **Figura 10** en metodología).

Para iniciar con los estudios de permeabilidad las células se sembraron en los insertos de las placas y en aproximadamente 5 días crecieron hasta confluencia y cubrieron la superficie del soporte de PTFE recubierto con colágeno. La formación de monocapas de MDCK con uniones estrechas funcionales fue monitoreada mediante microscopía y la medición de la TEER. El uso de membranas semipermeables ópticamente transparentes para el cultivo, permitió observar la formación de la monocapa a través de un microscopio óptico.

Una de las grandes ventajas de trabajar con cultivos de MDCK es que estas células alcanzan una confluencia en muy poco tiempo, la **Figura 12A** muestra la confluencia de las células epiteliales sobre la membrana de PTFE al segundo día de haberse cultivado, de aproximadamente el 75 %, mientras que en la **Figura 12B** la confluencia es aproximadamente del 95% al cuarto día de iniciado el ensayo, lo que permite observar que la monocapa está prácticamente formada.

Los valores de TEER proporcionaron una simple estimación rápida de la formación de uniones estrechas. Su valor promedio al quinto día de haberse cultivado las células se encontró en el intervalo de 180 a 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, lo cual nos indicó la formación de la monocapa.

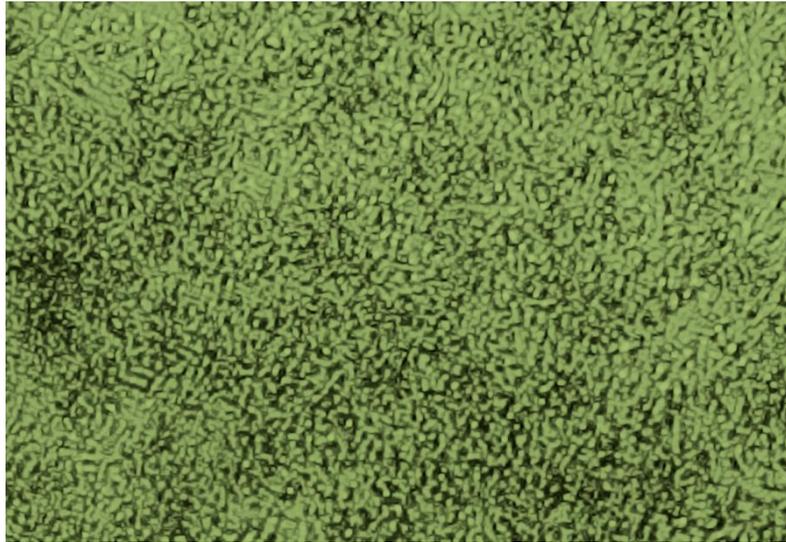
**A****B**

FIGURA 12. Formación de monocapa celular sobre membrana semipermeable de PTFE. Las células MDCK se cultivaron en la cámara apical de placas Transwell de 12 pozos Corning, se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de HR. **A)** Células MDCK vistas al microscopio (10x) al segundo día de haberse sembrado, la monocapa aún no se había formado por lo que lograban verse al fondo las hebras de la membrana semipermeable. **B)** Monocapa celular formada al cuarto día de cultivo, las células epiteliales cubrían casi por completo el filtro semipermeable. Al quinto día, cuando la monocapa recubrió por completo la membrana de PTFE y el valor de TEER fue el indicado pudo iniciarse con el estudio.



Tras la formación de la monocapa, la permeabilidad de la 4-fenilcumarina disuelta en solución amortiguadora de Hank a pH 7.45 como medio de transporte, se evaluó en dos direcciones AP-BS y BS-AP a tres concentraciones diferentes, 4, 8 y 16µg/ml. A fin de establecer la aptitud del modelo, la FDA recomienda el uso de estándares de permeabilidad por lo que se empleó clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina, a una concentración de 8µg/ml, como estándares de alta y baja permeabilidad, respectivamente.

Luego de un periodo de ensayo de dos horas, con muestreos cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos durante la segunda, las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de líquidos para determinar la cantidad de analito que había sido capaz de permear a través de la barrera formada por la monocapa de células epiteliales.

Para la cuantificación de las muestras correspondientes a los estándares de permeabilidad se siguieron las metodologías bioanalíticas desarrolladas y validadas por Mares en 2013, mientras que para la cuantificación del fitofármaco se utilizó una metodología desarrollada y validada en nuestro laboratorio. Los resultados de esta validación se encuentran publicados en un PNO interno (2013). En el **ANEXO 1** se presenta un resumen de dichos resultados, los cuales demostraron que el método es exacto, preciso, selectivo, sensible y estable, de acuerdo a lo dispuesto en Guías Internacionales para la Validación de Método Bioanalíticos, como la establecida por la FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* (2001) y la establecida por la ICH (International Conference on Harmonisation), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005), así como lo indicado para la validación de método analíticos para el análisis de muestras biológicas en la *NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.*

Las señales cromatográficas obtenidas tras el análisis de las muestras se observan en las **Figuras 13 y 14**.

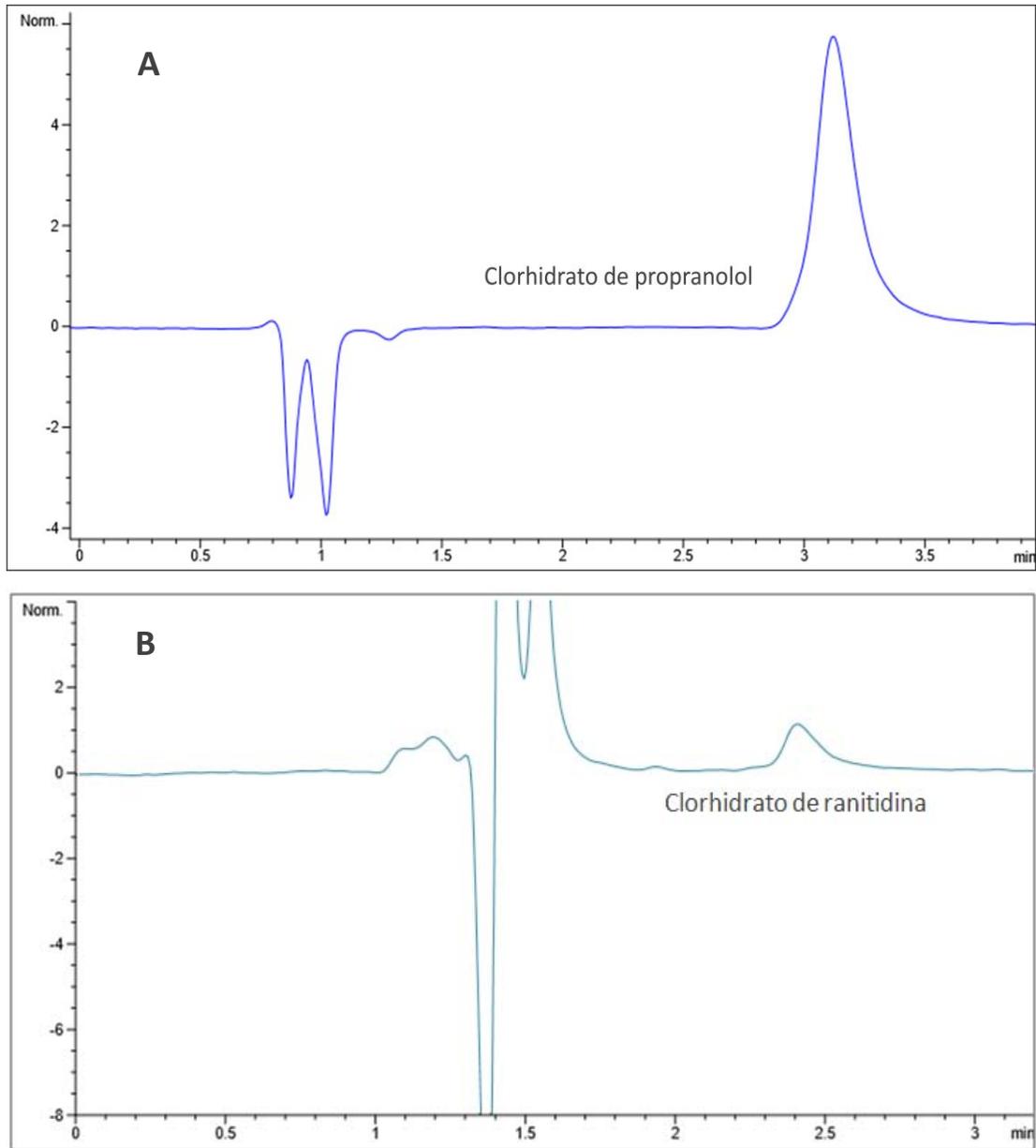


FIGURA 13. Señales cromatográfica de los estándares de permeabilidad. Muestras analizadas en HPLC *Agilent 1100*; tomadas de la cámara BS después de una (B) y dos (A) horas de ensayo en dirección AP-BS, evaluando una solución de 8 $\mu\text{g/ml}$. **A)** Clorhidrato de propranolol (alta permeabilidad). *Condiciones cromatográficas:* Columna *Agilent Zorbax Eclipse Plus SB-C18*, 4.6x150mm, 3.5 μm . Fase móvil, Metanol:Buffer fofatos 0.01M pH 7.6 (70:30). Velocidad de flujo 0.5 ml/min. Longitud de onda 322 nm. Temperatura ambiente. **B)** Clorhidrato de ranitidina (baja permeabilidad). *Condiciones cromatográficas:* Columna *Agilent Zorbax SB-C18*, 4.6x150mm, 3.5 μm . Fase móvil, Metanol:Buffer fofatos 0.01M pH 7.6 (60:40). Velocidad de flujo 1.0 ml/min. Longitud de onda 290 nm. Temperatura ambiente (Mares, 2013).

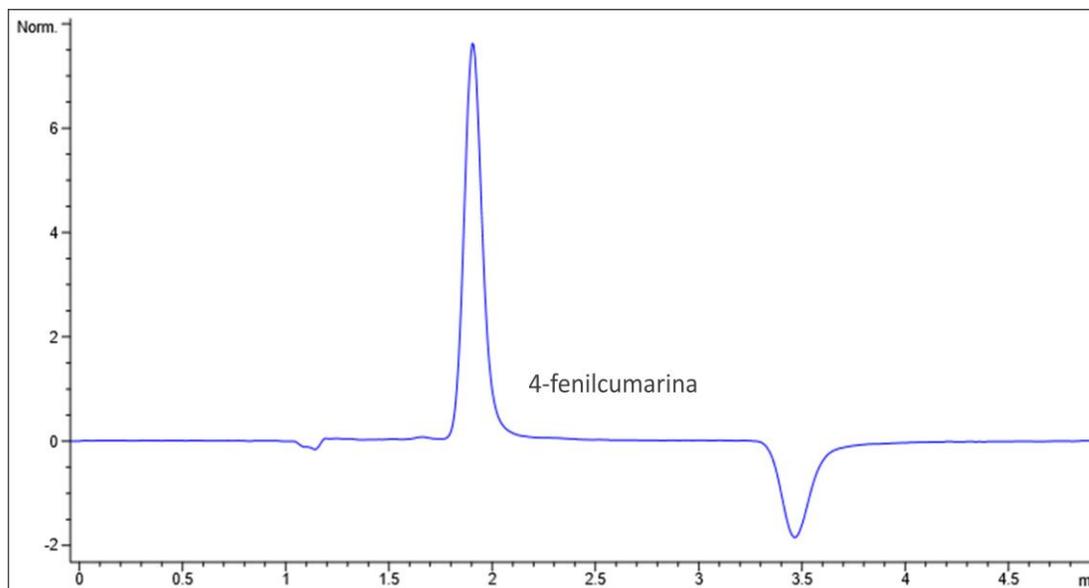


FIGURA 14. Señal cromatográfica de 4-fenilcumarina. Muestra tomada de la cámara basolateral después de una hora de ensayo en dirección AP-BS, evaluando una solución de 8 $\mu\text{g/ml}$. Analizada en HPLC *Agilent 1100* a las siguientes condiciones cromatográficas: Columna Symmetry C18; 4.6 x 150mm; 5 μm . Fase móvil, Metanol:Agua acidificada ATF 0.1% (50:50). Velocidad de flujo 1.2 ml/min. Longitud de onda 328 nm. Temperatura 25°C.

Los estudios de permeabilidad suelen realizarse bajo condiciones de iso-pH (mismo pH en ambas cámaras), debido a que el uso de un gradiente de pH puede llevar a una confusión en los resultados, dado que la difusión pasiva de los ácidos mejora en la dirección de mayor pH y la de bases mejora en la dirección de menor pH. Por lo tanto, podría parecer que los ácidos experimentan un transporte activo y las bases experimentan un mecanismo de eflujo (Kerns y Di, 2008).

Otro de los parámetros a considerar en los ensayos de permeabilidad es la concentración de los compuestos, en este caso se trabajó a las concentraciones de 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ porque se siguió una metodología propuesta en nuestro laboratorio, no obstante las concentraciones de trabajo para futuros ensayos deberían aumentarse a un mínimo de 25 $\mu\text{g/ml}$, pues se ha argumentado que la concentración de muchos fármacos en el lumen del tracto gastrointestinal tras la administración oral es a menudo en el intervalo de 50 a 100 μM (Singh *et al.*, 2014)



y en nuestro ensayo la solución más concentrada alcanzó sólo una concentración de 35 μM , aproximadamente (16 $\mu\text{g/ml}$).

Los experimentos utilizando monocapas celulares no sólo permiten determinar el tipo de transporte que está favoreciendo el paso del fármaco a través de la membrana de células epiteliales, sino también ayudan a establecer si existen transportadores de membrana celular que estén favoreciendo el tránsito transmembranal.

La evaluación del transporte en dirección AP-BS nos proporcionó un valor para la permeabilidad en la dirección de absorción, que modela la absorción en el tracto gastrointestinal, es decir, el paso del fármaco desde lumen hasta la circulación sistémica. Por otro lado, con la evaluación del transporte en dirección BS-AP lo que se buscó fue estudiar la expresión funcional de transportadores de membrana o sistemas de circulación (Kerns y Di, 2008; FDA, 2000).

La absorción intestinal de un fármaco está controlada por la velocidad de disolución y solubilidad, que determinan qué tan rápido un fármaco alcanza una concentración máxima en el fluido luminal, y el coeficiente de permeabilidad, el cual se relaciona con la velocidad a la cual el fármaco disuelto atravesará la pared intestinal para alcanzar la circulación sanguínea portal (Herrera *et al.*, 2012). La **Tabla 10** muestra las velocidades de transporte promedio (dQ/dt) del fitofármaco y los estándares de permeabilidad ($n=3$) a las diferentes concentraciones en ambas direcciones, las cuales corresponden a la pendiente obtenida a partir de graficar la cantidad acumulada de cada compuesto en función del tiempo de muestreo.



Tabla 10.

Velocidad de transporte promedio (n=3) de 4-fenilcumarina, clorhidrato de propranolol (estándar de alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (estándar de baja permeabilidad) en dirección AP-BS y BS-AP a través de monocapas celulares de MDCK.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	Clorhidrato de propranolol	4-Fenilcumarina			Clorhidrato de ranitidina
	8.00	4.00	8.00	16.00	8.00
(dQ/dt)* AP-BS ($10^{-4} \mu\text{g/s}$)	18.639	8.087	11.700	17.067	2.293
SD**($10^{-4} \mu\text{g/s}$)	± 3.196	± 0.607	± 0.781	± 3.523	± 0.091
(dQ/dt) BS-AP ($10^{-4} \mu\text{g/s}$)	12.457	4.877	10.510	14.733	1.402
SD**($10^{-4} \mu\text{g/s}$)	± 1.239	± 0.718	± 0.945	± 0.586	± 0.604

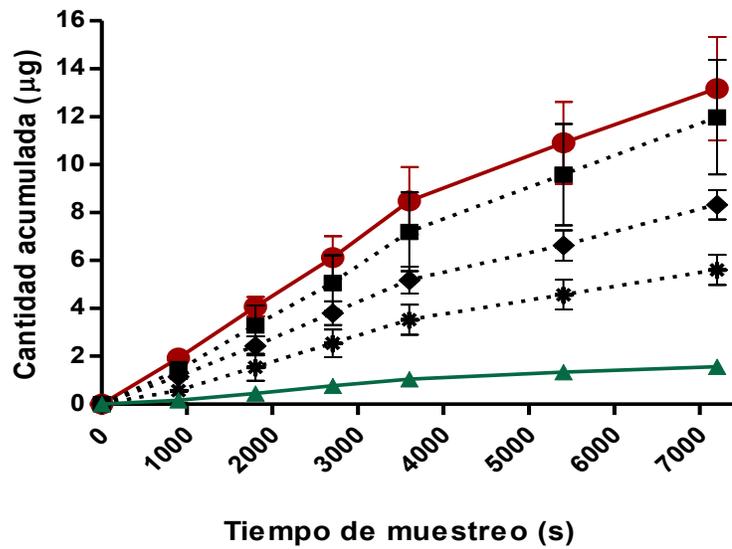
*(dQ/dt): Velocidad de transporte **SD: Desviación estándar

Por lo que respecta al grado de permeación (**Figura 15**), en ambas direcciones la velocidad de transporte del fitofármaco fue directamente proporcional con respecto a la concentración de las soluciones, a mayor concentración mayor fue también la velocidad de transporte. La **Figura 15A** hace notar con claridad que la velocidad a la que fue transportada la 4-fenilcumarina a través de la monocapa celular de MDCK en la dirección de absorción (AP-BS) siguió una tendencia que se asemejó más al estándar de alta permeabilidad, sin embargo su paso a través de la monocapa no fue tan o más rápido que el del clorhidrato de propranolol, indicando que su permeabilidad fue más bien moderada. Por su parte, en la **Figura 15B** se observa que el éxodo del fitofármaco a las concentraciones de 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ es similar al del estándar de alta permeabilidad, mientras que a la concentración más pequeña el éxodo es mucho más lento.



A

AP-BS



B

BS-AP

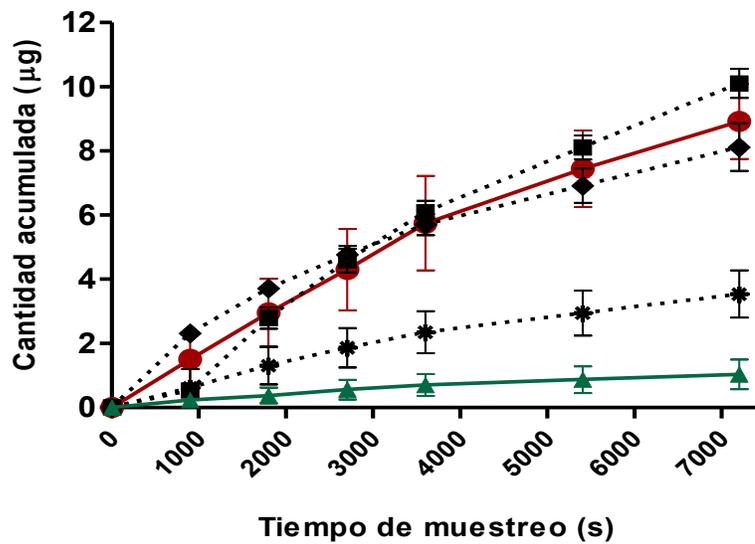


FIGURA 15. Velocidad de transporte. Cambio de la cantidad acumulada promedio del fitofármaco y los estándares de permeabilidad en la cámara receptora en función del tiempo (segundos). Después de colocar soluciones de 4 µg/ml (●×●), 8 µg/ml (●◆●) y 16 µg/ml de 4-fenilcumarina (●■●), y de 8 µg/ml de clorhidrato de propranolol (—●—) y clorhidrato de ranitidina (—▲—) en la cámara receptora del sistema de medición, se tomaron muestras en la cámara donadora a diferentes tiempos. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). **A)** Transporte en dirección AP-BS, la solución de trabajo se adicionó a la cámara apical y se muestreo en la cámara basolateral. **B)** Transporte en dirección BS-AP, la solución de trabajo se adicionó a la cámara basolateral y se muestreo en la cámara apical.



Una de las características del transporte de moléculas por difusión pasiva, es la no saturación del transporte, que se debe a que como el fármaco absorbido es retirado constantemente por la sangre, que lo transporta al resto del organismo, no llega a alcanzarse un equilibrio y el proceso continúa hasta que la absorción es completa (Armijo, 1997). En la **Figura 15**, podemos ver que aunque la velocidad con que se transportó el fitofármaco disminuyó después de la primera hora (3600 segundos) de ensayo, el paso de moléculas continuó durante la segunda hora.

La velocidad de transporte en la mayoría de los casos fue ligeramente mayor en sentido AP-BS, lo cual es un indicio de la falta de transportadores de mecanismos de eflujo. Ahora bien, de acuerdo a lo que establece la FDA los resultados indican que la 4-fenilcumarina fue transportada por difusión pasiva aparente a través de las células MDCK, debido a que el transporte no fue saturable y no existió una diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de transporte en ambos sentidos, AP-BS y BS-AP a las concentraciones de 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, la diferencia sólo fue significativa a la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, como se observa en la **Figura 16**.

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{aap}) de cada compuesto se determinó mediante la fórmula indicada en la metodología, la cual relaciona la concentración del fármaco y el área superficial de la monocapa celular con la velocidad de transporte. Los valores de permeabilidad obtenidos están dados en el orden de 10^{-5} cm/s (**Tabla 11**), lo que para el caso de los estándares no coincide con lo que se encuentra en la literatura que en su mayoría se presentan en el orden de 10^{-6} cm/s. A pesar de ello pueden considerarse fiables dado que estos resultados pueden variar entre laboratorios debido a muchos factores como son la heterogeneidad de las líneas celulares, las condiciones de cultivo (fuente de suero, frecuencia de los cambios de medios, componentes de medio de cultivo), y las diferentes metodologías utilizadas para realizar la determinación, lo que ha llevado a que un mismo fármaco presente diferentes valores de permeabilidad (Kerns y Di, 2008; Herrera *et al.*, 2012; Balimane *et al.*, 2000).

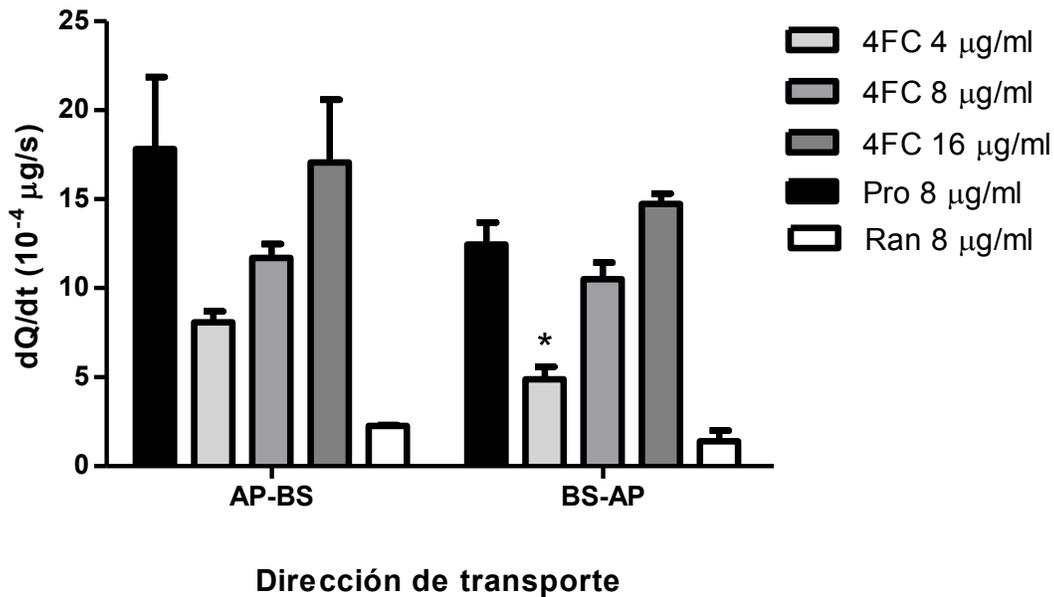


FIGURA 16. Velocidad de transporte (dQ/dt). Velocidad de transporte promedio del fitofármaco (4FC) a las concentraciones de 4, 8 y 16 µg/ml y de los estándares de permeabilidad, clorhidrato de propranolol (Pro) y clorhidrato de ranitidina (Ran) a 8 µg/ml, en ambas direcciones, AP-BS Y BS-AP (n=3); *p < 0.001 vs dQ/dt en dirección AP-BS.

Así también, se calculó la relación de permeabilidad direccional, que evaluó el potencial de interacción de fármacos con transportadores de eflujo (Yazdanian *et al.*, 2004). Con el fin de identificar si la entrada del fitofármaco es relativamente rápida pero su salida es lenta a través de la barrera formada por las células, la proporción de permeabilidad se calculó mediante la relación del Paap promedio AP-BS y el Paap promedio BS-AP (n=3). Los datos se presentan también en la **Tabla 11** y muestran que los valores de esta relación estuvieron todos por encima de 1, lo que indica que la entrada de los compuestos en las células es mayor que su salida. Esto también se observó al examinar la relación de eflujo que corresponde a la relación del Paap promedio BS-AP y el Paap promedio AP-BS. Los valores por debajo de 1 revelaron un bajo éxodo de los compuestos.



Tabla 11.

Coeficiente promedio de permeabilidad aparente (n=3) en dirección AP-BS y BS-AP a través de monocapas celulares de MDCK y relación de coeficientes de permeabilidad, de 4-fenilcumarina, clorhidrato de propranolol (alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (baja permeabilidad).

CONCENTRACIÓN (µg/ml)		Clorhidrato de propranolol	4-Fenilcumarina			Clorhidrato de ranitidina
		8.00	4.00	8.00	16.00	8.00
Paap* AP-BS (10 ⁻⁵ cm/s)		20.803	18.051	13.058	9.524	2.560
SD**(10 ⁻⁵ cm/s)		± 3.567	± 1.355	± 0.872	± 1.966	± 0.101
Paap BS-AP (10 ⁻⁵ cm/s)		13.903	10.885	11.730	8.222	1.565
SD (10 ⁻⁵ cm/s)		± 1.383	± 1.604	± 1.054	± 0.327	± 0.674
Relación Paap	(AP-BS)/(BS-AP)	1.5	1.7	1.1	1.2	1.6
	(BS-AP)/(AP-BS)	0.7	0.6	0.9	0.9	0.6

*Paap: Coeficiente de permeabilidad aparente **SD: Desviación estándar

Los Paap en dirección AP-BS y BS-AP de la 4-fenilcumarina no variaron mucho entre sí, lo mismo que en el clorhidrato de ranitidina lo que indicó que ambos compuestos difundieron pasivamente a través de la monocapa de células epiteliales. Con lo que respecta al clorhidrato de propranolol su Paap promedio en ambas direcciones fue un poco distinto, sin embargo fue mayor en sentido AP-BS, señalando que la entrada del compuesto fue mayor que su salida, por lo tanto no era posible que existieran transportadores de eflujo que estuvieran actuando.

La relación de Paap ayuda a visualizar mejor lo dicho anteriormente, pues considerando que los compuestos que se transportaron sólo por difusión pasiva debieron tener valores de permeabilidad similares en cualquier dirección, sus valores de proporción de permeabilidad direccional debieron ser aproximadamente de 1 (Yazdanian *et al.*, 2004), como se observa claramente en el caso de la 4-fenilcumarina a las concentraciones de 8 y 16 µg/ml. Mientras que para fármacos que mostraron una afinidad por las bombas de eflujo celular y son transportados



activamente fuera de las células, la relación de Paap debe ser mayor o igual a 2, dado que la permeabilidad de BS-AP es mayor que de AP-BS (Kerns y Di, 2008). El cual no fue el caso ni del fitofármaco ni de los estándares.

La permeabilidad moderada del fitofármaco, que se había mencionado anteriormente, se hace evidente también al analizar los valores de Paap promedio, puesto que los coeficientes de la 4-fenilcumarina a las diferentes concentraciones probadas en ambas direcciones, se encontraron entre ambos estándares, es decir, los Paap del fitofármacos fueron mucho mayores que el que presentó el clorhidrato de ranitidina (estándar de baja permeabilidad) pero inferiores al del clorhidrato de propranolol (estándar de alta permeabilidad), (**Figura 17**), por lo que de acuerdo a la FDA, al no presentar una permeabilidad igual o mayor que la del patrón interno de alta permeabilidad, el fitofármaco no puede clasificarse como altamente permeable.

En lo que a los estándares de permeabilidad respecta, el Paap del clorhidrato de propranolol en sentido AP-BS obtenido experimentalmente es muy similar al reportado por Irvine y colaboradores (1999), cuyo valor es de 1700 nm/s ($17E-5$ cm/s), mientras que para el clorhidrato de ranitidina no encontramos un valor reportado, pero a pesar de ello el Paap calculado es menor a $4E-5$ cm/s con lo que es posible clasificarlo como de baja permeabilidad (Molnár and Keserű, 2011). Así mismo, al comparar los valores de Paap promedio se encontró que el Paap del clorhidrato de propranolol fue aproximadamente entre 8 y 9 veces mayor que el obtenido para clorhidrato de ranitidina, lo que demostró que el modelo funcionó adecuadamente y por tanto que los resultados obtenidos para el fitofármaco, fueron confiables.

La evaluación de la integridad de la monocapa celular durante todo el proceso de transporte fue también una medida de la confiabilidad de los ensayos realizados para lo cual se añadió a la superficie o cámara apical una solución de Lucifer Yellow. Este marcador de absorción viaja a través de la monocapa de células a través de una difusión pasiva paracelular, es decir, a través de espacios entre las



células y tiene una baja permeabilidad. Por lo tanto, no es capaz de pasar a través de la monocapa celular cuando las uniones estrechas se mantienen entre las células (Aulton, 2004; Corning, s.f.). En todos los casos menos del 1% de Lucifer Yellow atravesó la monocapa en dos horas, lo que indicó que la monocapa mantuvo su integridad.

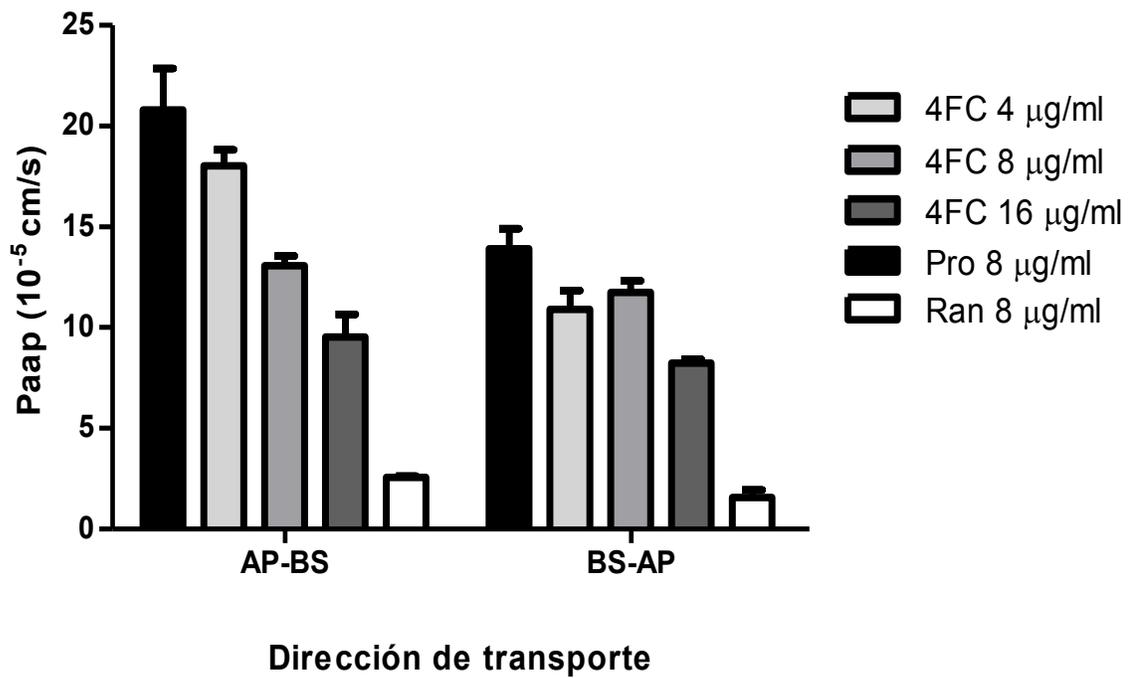


FIGURA 17. Coeficientes de permeabilidad aparente (Paap). El Paap relaciona la concentración del fármaco y el área superficial de la monocapa celular con la velocidad de transporte. Las soluciones de 4-fenilcumarina (4FC) a 4, 8 y 16 µg/ml, presentaron valores de permeabilidad mayores que el clorhidrato de ranitidina (Ran) pero menores que el clorhidrato de propranolol (Pro), diferencia más marcada en dirección AP-BS, lo que sugiere una permeabilidad moderada para el fitofármaco. El Paap del estándar de alta permeabilidad fue aproximadamente entre 8 y 9 veces mayor que el obtenido por el estándar de baja permeabilidad, resultados que demostraron la aptitud del modelo utilizado.



Finalmente, los resultados obtenidos demuestran que el proceso de absorción del fitofármaco a través de la monocapa celular de MDCK, que simulaba a la membrana intestinal, se debe a un transporte pasivo aparente lo cual parece razonable tomando en consideración propiedades fisicoquímica de la 4-fenilcumarina como su peso molecular y su coeficiente de partición.

El peso molecular de 462 g/mol del fitofármaco (Guerrero, 2007) nos hacen considerarla como una molécula de un tamaño relativamente mediano y el coeficiente de partición de 3.35 (datos no publicados), según Panchagnula y Thomas (2000) significa que el compuesto es altamente lipofílico; de acuerdo a lo que se encuentra en la literatura, la mayor parte de los fármacos tienen un tamaño mediano que permite su paso a través de las membranas por difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración. Así mismo, la velocidad, según la ley de Fick, será tanto mayor cuanto mayor sea el gradiente de concentración, menor sea el tamaño de la molécula y mayor sea su liposolubilidad (Armijo, 1997).



6. CONCLUSIONES

La 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina no presenta efecto citotóxico significativo sobre la línea celular MDCK en un amplio rango de concentraciones, que va de 0.1 a 100 µg/ml.

Así también, el fitofármaco se absorbe moderadamente a las concentraciones de 4, 8 y 16 µg/ml, mediante un transporte por difusión pasiva aparente a través de monocapas de células epiteliales de la línea celular MDCK.

El modelo *in vitro* utilizado, basado en cultivos celulares, proporciona datos confiables y reproducibles, lo que hace de él una excelente opción para la evaluación de la permeabilidad de fármacos durante el desarrollo de nuevos medicamentos, gracias a que ofrece una buena estimación de la absorción en el tracto gastrointestinal.

Por último, los resultados obtenidos representan una importante contribución a los estudios de fase preclínica de la 4-fenilcumarina ya que de poder comercializarse en un futuro como un medicamento herbolario, puede significar una gran alternativa en el tratamiento de personas diabéticas.



7. REFERENCIAS

Abeijón, P. (2009). *Heterocarbonucleósidos: Síntesis y evaluación biológica de análogos tiofenocondensados del abacavir*. Tesis de Doctorado. Universidade de Santiago de Compostela (USC).

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS, AEMPS (2010). *Cómo se regulan los Medicamentos y Productos Sanitarios en España*. Primera Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social.

Åkerblom, H. K., Vaarala, O., Hyöty, H., Ilonen, J. & Knip, M. (2002). Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)* **115**: 18-29.

Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Medicina tradicional. *Foro Mundial de la Salud* **14**: 390-395.

American Diabetes Association, ADA (2007). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. *Diabetes Care* **30**: S42-S47.

Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P. & Crison, J.R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of *In Vitro* Drug Product Dissolution and *In Vivo* Bioavailability. *Pharmaceutical Research* **12**(3): 413-420.

Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). Mexican Plants with Hypoglycaemic Effect Used in the Treatment of Diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* **99**: 325-348.

Armijo, J. A. (1997). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En Flores, J. (Ed.), *Farmacología Humana* (47-72). España: Masson.

Artursson, P. (1990). Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs Over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **79**(6): 476-482.



- Artursson, P. & Karlsson, J. (1991). Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **175**(3): 880-885.
- Ascaso, J.F. (2014). Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. *Med Clin (Barc)* **143**(3): 117-123.
- Augustijns, P., Wuyts, B., Hens, B., Annaert, P., Butler, J. and Brouwers, J. (2014). A Review of Drug Solubility in Human Intestinal Fluids: Implications for the Prediction of Oral Absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**: 322–332
- Aulton, M.E. (2004). *Farmacía. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. (2a ed.) Madrid, España: Elsevier.
- Avdeef, A. (2003). *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. USA: Wiley-Interscience.
- Balimane, P.V., Chong, S. and Morrison, R.A. (2000). Current Methodologies Used for Evaluation of Intestinal Permeability and Absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**: 301-312.
- Barthelson, R. A., Sundareshan, P., Galbraith, D. W. and Woosley, R. L. (2006). Development of a Comprehensive Detection Method for Medicinal and Toxic Plant Species. *American Journal of Botany* **93**(4): 566–574.
- Becker, W., Kleinsmith, L. y Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula*. (6a ed.) Madrid: Pearson Educación.
- Braun, A., Hammerle, S., Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M., Kramer, S. & Wunderli-Allenspach, H. (2000). Cell Cultures as Tools in Biopharmacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **11**(Suppl. 2): S51–S60.



Butler, M. (2005). *Animal Cell Culture and Technology*. (2a ed.) USA: BIOS Scientific Publishers.

Cao, X., Yu, L.X. and Sun, D. (2008). Drug absorption principles. En **Krishna, R. & Yu, L.** (Ed.), *Biopharmaceutics Applications in Drug Development* (75-100). USA: Springer.

Castaño, M.E. (2000). Cultivos celulares. En Londoño, J.O. (Ed.), *Principios de virología* (29-46). Colombia: Fondo Editorial Biogénesis.

Chan, L., Lowes, S. & Hirst, B.H. (2004). The ABCs of Drug Transport in Intestine and Liver: Efflux Proteins Limiting Drug Absorption and Bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21**: 25–51

Cho, M.J., Thompson, D.P., Cramer, C.T, Vidmar, T.J. & Scieszka, J.F. (1989). The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Epithelial Cell Monolayer as a Model Cellular Transport Barrier. *Pharmaceutical Research* **6**(1): 71-77.

Corning (s.f.). Corning® HTS Transwell®-96 Permeable Support Protocols for Drug Transport. Recuperado el 6 de mayo de 2015, de <http://www.corning.com>.

Corning (2013). Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide. Recuperado el 2 de agosto de 2014, de <http://www.corning.com/lifesciences>.

Cristians, S. (2009). *Investigación farmacológica y química de las hojas de Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae): Una contribución para la elaboración de su monografía tipo OMS*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Cristians, S. (2013). *Parámetros de calidad, seguridad y eficacia de las infusiones de hojas y corteza de Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock y H. standleyana Bullock (Rubiaceae): un enfoque al desarrollo de preparados fititerapéuticos*. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM.



Cristians, S., Gurerrero-Analco, J. A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R. y Mata, R. (2009). Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *Journal of Natural Products* **72**: 408-413.

Dahan, A., Miller, J.M. & Amidon, G. (2009). Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs. *The AAPS Journal* **11**(4): 740-746.

De Miguel, M., Gracia, C., Martín, L. y Escribano, M. (2012). *Guía de desarrollos preclínicos*. España: Genoma España.

Escobar, L., Alfonso, P.A. y Aristizábal, F.A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev.Colomb. Biotecnol.* **XI**(2): 49-56.

Estrada, L. (2014). *Efecto limitante de la glicoproteína-P como transportador intestinal de eflujo en la absorción oral y biodisponibilidad de fármacos*. Tesina. Facultad de Química. UNAM.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, EMEA (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Recuperado 6 de mayo de 2015, de <http://www.ema.europa.eu/>.

European Medicines Agency, EMEA (2010). *Guideline on the Investigation of Bioequivalence*. Recuperado el 22 de junio de 2015 de: <http://www.ema.europa.eu/>.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES, FID (2013). Atlas de la diabetes de la FID. (6a ed.). Recuperado el 16 de noviembre de 2014 de: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

Field, M. (2003). Intestinal Ion Transport and The Pathophysiology of Diarrhea. *J. Clin. Invest* **111**(7): 931-943.



FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2000). Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Recuperado el 26 de febrero de 2015 de: <http://www.fda.gov/>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2015). Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Recuperado el 24 de junio de 2015 de: <http://www.fda.gov/>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (1999). *Manual of Policies and Procedures Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*. USA: Department of Health and Human Services.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Recuperado 6 de mayo de 2015, de <http://www.fda.gov/Drugs/>.

Fowler, R. (2013). Challenges and Opportunities in the Drug-Delivery Technology Market. Recuperado el 12 de febrero de 2015 de: <http://www.pharmaphorum.com/>.

Galván, J.L. (2009). Pruebas de tamizaje. *Red de Comunicación e Integración Biomédica*. 1-6.

Ganong, W. F. (2002). *Fisiología médica*. (18a ed.) México: Editorial El Manual Moderno.

García de Alba, J.E., Ramírez, B.C., Robles, G., Zañudo, J., Salcedo, A.L. y García de Alba, J.E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*. 29-44.

Guerrero, J. A. (2007). *Compuestos antihiperlipidémicos y antinociceptivos de la especie Hintonia standleyana Bullock (Rubiaceae). Una contribución a la determinación de los parámetros de inocuidad, calidad y eficacia de la droga cruda*. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Químicas. UNAM.



Guerrero-Analco, J. A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2005). Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Planta Médica* **71**: 1099-1105.

Guerrero-Analco, J. A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A. & Mata, R. (2007). Antidiabetic Properties of Selected Mexican Copalchis of the Rubiaceae Family. *Phytochemistry* **68**: 2087-2095.

Guo, Y. & Shen, H. (2004). pKa, Solubility, and Lipophilicity. Assessing Physicochemical Properties of Lead Compounds. En Yan, Z. & Caldwell, G.W. (Eds.), *Methods in Pharmacology and Toxicology. Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods* (1-17). USA: Humana Press.

Hellinger, E. & Vastag, M. (2011). Intestinal Absorption and Models of Penetration. En Tihanyi, K. & Vastag, M. (Ed.), *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates* (86-101). USA: Bentham e Books.

Hernández, G., Moreno, A., Zaragozá, F. y Porras, A. (2011). *MediPharm. Tratado de medicina farmacéutica*. España: Editorial Médica Panamericana.

Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P. y Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México* **55**(Supl 2): S129-S136.

Herrera, D., Hernández, E., Espinosa, J. C., De la Luz, I., Beltrán, A. A. y Martínez, J. M. (2012). Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Rev Mex Cienc Farm* **43**(1): 18-32.

Hoogesteger, C. (1994). *Uso de plantas medicinales*. México: Árbol Editorial.

Hu, M., Ling, J., Lin, H. & Che, J. (2004). Use of Caco-2 Cell Monolayers to Study Drug Absorption and Metabolism. En Yan, Z. & Caldwell, G.W. (Eds.), *Methods in Pharmacology and Toxicology. Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods* (19-35). USA: Humana Press.



Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI (2013). *Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes*. Aguascalientes.

Irvine, J., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J.W., Selick, H.E. & Grove, J.R. (1999). MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **88**(1): 28-33.

Jiménez-Corona, A., Aguilar-Salinas, C. A., Rojas-Martínez, R. y Hernández-Ávila, M. (2013). Diabetes mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones para su prevención y control. *Salud Pública de México* **55**(Supl 2): S137-S143.

Kerns, E.H. (2001). High Throughput Physicochemical Profiling for Drug Discover. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90**(11): 1838-1858.

Kerns, E.H. & Di, L. (2008). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. (1a ed.) USA: Elsevier.

Kota, S.K., Meher, L.K., Jammula, S., Kota, Siva K. & Modi, K. D. (2012). Genetics of type 2 diabetes mellitus and other specific types of diabetes; its role in treatment modalities. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* **6**: 54–58.

Laboratorio de Investigación en Biofarmacia (2013). *PNO-Validación del método de cuantificación para la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en solución de Hank*. Facultad de Química: UNAM.

Lennernäs, H. (2014). Regional Intestinal Drug Permeation: Biopharmaceutics and Drug Development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**: 333–341.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell (2006). *Biología celular y molecular*. (5a ed.) Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.



Mancipe, L.F., Ramírez, G., Jaime, J. y Vera, V. (2011). Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. *Ciencias Biomédicas* **9**(15): 83-93.

Mares, M. (2013). *Estudios de permeabilidad de propranolol y ranitidina en monocapas celulares de la línea celular MDCK*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México*. (6a ed.). México: Ediciones Botas.

Molnár L. and Keserű, G.M. (2011). Recent Advances in ADME Predictions. En Tihanyi, K. & Vastag, M. (Ed.), *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates* (3-32). USA: Bentham e Books.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., et al. (1991). Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**(11): 757-766.

Organización Mundial de la Salud, OMS (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. China: OMS.

Panchagnula, R. & Thomas, N.S. (2000). Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int J Pharmaceutics* **201**:131-50.

Pastan, I., Gottesman, M.M., Ueda, K., Lovelace, E., Rutherford, A.V. & Willingham, M.C. (1988). A Retrovirus Carrying an MDR1 cDNA Confers Multidrug Resistance and Polarized Expression of P-glycoprotein in MDCK Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(12): 4486-4490.

Pauwels, R. (2006). Aspects of Successful Drug Discovery and Development. *Antiviral Research* **71**:77-89.



- Pedrianes, P. B. y De Pablos, P. L. (2010). Seguridad y tolerabilidad de los antidiabéticos orales en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Med Clin (Barc)* **135**(Supl 2): 20-26.
- Permutt, M. A., Wasson, J. & Cox, N. (2005). Genetic epidemiology of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **115**(6): 1431–1439.
- Prentis, R.A., Lis, Y. & Walker, S.R. (1988). Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br. J. clin. Pharmac.* **25**:387-396.
- Puig-Domingo, M. y De Leiva Hidalgo, A. (1995). *Diabetes mellitus: concepto, clasificación, etiología en Endocrinología clínica*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental*. (3a ed.) Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Rivera, O.M., Hernández, Y., García de la Vega, J.M, Grau, R., Marrero, Y. y Cruz, M. (2013). Perspectiva general sobre el proceso de desarrollo de fármacos y las técnicas de cribado virtual basadas en la similitud molecular. *An. Real Acad. Farm.* **79**(4): 530-561.
- Romero, M. V., Álvarez, J. M., Gómez, E. y Lozano, J. J. (2012). Manejo terapéutico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Antidiabéticos orales. *Medicine* **11**(18): 1073-1081.
- Ross, M. y Pawlina, W. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. (5a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- San Román del Barrio, L. (2013). *Desarrollo de nuevos fármacos: desde la invención a la Farmacia*. España: Universidad de Salamanca.



Schlaepfer, L. y Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **41**(4): 18-27.

Secretaría de Salud (1998). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Recuperado 6 de mayo de 2015, de <http://www.salud.gob.mx>.

Shah, V.P. & Amidon, G.L. (2014). G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *In Vitro* Drug Product Dissolution and *In Vivo* Bioavailability, *Pharm Res* **12**, 413–420, 1995—Backstory of BCS. *The AAPS Journal* **16**(5): 894-898.

Silverthorn, D. U. (2009). *Fisiología humana: un enfoque integrado*. (4a ed.) Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Singh, R., Michel, D., Das, U., Dimmock, J.R. y Alcorn, J. (2014). Cytotoxic 1,5-diaryl-3-oxo-1,5-pentadienes: An Assessment and Comparison of Membrane Permeability Using Caco-2 and MDCK Monolayers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **24**: 5199–5202.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., et al. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**(13): 1107-1112.

Stenberg, P., Bergström, C., Luthman, K. & Artursson, P. (2002). Theoretical Predictions of Drug Absorption in Drug Discovery and Development. *Clin Pharmacokinet* **41**(11): 878-899.

Tavelin, S., Gråsjö, J., Taipalensuu, J., Ocklind, G. & Artursson, P. (2002). Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. En Wise, C.



(Ed.), *Methods in molecular biology: Epithelial Cell Culture Protocols* (233-272).USA: Humana Press.

The College of Physicians of Philadelphia (s.f.). *Early Tissue and Cell Culture in Vaccine Development*. Recuperado el 31 de marzo de 2015, de <http://www.historyofvaccines.org>.

Ward, P.D., Tippin, T.K. & Thakker, D.R. (2000). Enhancing Paracellular Permeability by Modulating Epithelial Tight Junctions. *Pharm Sci Technol To* **3**(10): 346-358.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2004). *Guidelines on Developing Consumer Information on Proper Use of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*. Italia: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2005). *Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requirements to Establish Interchangeability*. Recuperado el 22 de junio de 2015 de: <http://www.who.int/>.

Yazdanian, M., Briggs, K., Jankovsky, C. & Hawi, A. (2004). The “High Solubility” Definition of the Current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System May Be Too Strict for Acidic Drugs. *Pharmaceutical Research* **21**(2): 293-299.

ANEXO 1.

Resumen de resultados de la validación del método bioanalítico para la cuantificación de la 4-fenilcumarina*

		Criterio de aceptación	Resultado obtenido			
Linealidad del sistema		$r^2 > 0.99$	$r^2 = 0.9998$			
Selectividad del método		No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.	Sin interferencias			
Linealidad del método		$r^2 > 0.99$; DEA ≤ 15 para cada nivel de concentración y/o DEA ≤ 20 para el nivel de concentración más baja	$r^2 = 0.9993$ DEA < 15 a cada nivel de concentración			
			MCB¹	MCM²	MCA³	
Exactitud		Cada muestra control DEA $\leq 15\%$	DEA⁴ (%)	5.81	3.24	3.02
Precisión	Repetibilidad	Cada muestra control CV $\leq 15\%$	CV⁵ (%)	3.24	2.88	0.96
	Reproducibilidad		CV (%)	5.99	0.52	1.02
Recuperación absoluta (Recobro)		El recobro no debe ser necesariamente del 100%, pero sí reproducible en cada nivel de concentración.	Recobro	93.97%	96.88%	98.26%

¹MCB (Muestra Control Baja): 2 µg/ml. ²MCM (Muestra Control Media): 8 µg/ml. ³MCA (Muestra Control Alta): 25 µg/ml. ⁴DEA: Desviación estándar absoluta.

⁵CV: Coeficiente de variación. (*Datos tomados del PNO-Validación del método de cuantificación para la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en solución de Hank, 2013).

Resumen de resultados de la validación del método bioanalítico para la cuantificación de la 4-fenilcumarina* (continuación)

		Criterio de aceptación	Resultado obtenido			
			MCB	MCM	MCA	
Estabilidad	Temperatura ambiente ⁶	Cada muestra control CV ≤ 15% y DEA ≤ 15%	CV (%)	2.70	4.37	2.79
			DEA (%)	< 13.90	< 9.48	< 6.53
	Temperatura de refrigeración ⁶		CV (%)	1.78	0.66	3.00
			DEA (%)	< 6.04	< 4.69	< 5.71
	Ciclos de congelación ⁷		CV (%)	7.43	3.94	3.01
			DEA (%)	< 6.52	< 4.01	< 6.56
Tolerancia	MeOH:H ₂ O acidificada con ATF 0.1% (55:45)	Para la MCM el CV ≤ 15% y DEA ≤ 15%	CV (%) = 6.52 DEA (%) = < 13.29			
	MeOH:H ₂ O acidificada con ATF 0.1% (45:55)		CV (%) = 6.01 DEA (%) = < 13.39			
Límite de cuantificación		El valor promedio de la concentración más baja del rango de trabajo (1 µg/ml) cae dentro del ± 20% del valor nominal con CV < 20%	Concentración promedio = 1.12 µg/ml CV (%) = 0.83			

⁶Estabilidad a 24 horas. ⁷Dos ciclos de congelación-descongelación a -20°C y temperatura ambiente, respectivamente. (*Datos tomados del PNO-Validación del método de cuantificación para la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en solución de Hank, 2013).

Resultados de la validación del método bioanalítico para la cuantificación de la 4-fenilcumarina*

		Criterio de aceptación	Resultado Final
Linealidad del sistema		$r^2 > 0.98$	Cumple criterio
Selectividad del método		Señal no mayor al 20% de la concentración más baja	Cumple criterio
Linealidad del método		$r^2 > 0.98$; DEA ¹ ≤ 15 para cada nivel de concentración y/o DEA ≤ 20 para el nivel de concentración más baja	Cumple criterio
Límite de cuantificación		El valor promedio de la concentración más baja del rango de trabajo (1 $\mu\text{g/ml}$) cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con CV ² $< 20\%$	Cumple criterios
Exactitud		Cada muestra control DEA $\leq 15\%$	Cumple criterio
Precisión	Repetibilidad	Cada muestra control CV $\leq 15\%$	Cumple criterios
	Reproducibilidad		
Recuperación absoluta (Recobro)		El recobro no debe ser necesariamente del 100%, pero sí reproducible en cada nivel de concentración.	Cumple criterio
Estabilidad	Temperatura ambiente ³	Cada muestra control CV $\leq 15\%$ Y DEA $\leq 15\%$	Cumplen criterios
	Temperatura de refrigeración ³		
	Ciclos de congelación ⁴		
Tolerancia	MeOH:H ₂ O acidificada con ATF 0.1% (55:45)	Para la MCM ⁵ el CV $\leq 15\%$ y DEA $\leq 15\%$	Cumplen criterios
	MeOH:H ₂ O acidificada con ATF 0.1% (45:55)		

¹DEA: Desviación estándar absoluta. ²CV: Coeficiente de variación. ³Estabilidad a 24 horas. ⁴Dos ciclos de congelación-descongelación a -20°C y temperatura ambiente, respectivamente. ⁵MCM (Muestra Control Media): 8 $\mu\text{g/ml}$. (*Datos tomados del PNO-Validación del método de cuantificación para la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en solución de Hank, 2013).