

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD APARENTE
DE LOS COMPUESTOS DICLORADOS DERIVADOS DEL 1-
METILBENCIMIDAZOL EMPLEANDO A LA LINEA CELULAR CACO-2
COMO MODELO BIOLÓGICO "IN VITRO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O F A R M A C I A)
P R E S E N T A :
Q.F.B. MARIA DE JESUS MUÑOZ ESPINAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

2001



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:	Dr. Rafael Castillo Bocanegra Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Héctor Ponce Monter Centro Médico Siglo XXI
Secretario:	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez Instituto de Química, UNAM
Primer Suplente:	M. en C. Dinora Fabiola González Esquivel INN
Segundo Suplente:	M. en C. José Manuel Morales Hernández Facultad de Química, UNAM

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Parasitología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Asesor del Tema: Dra. Lilián Yépez Mulia

Sustentante: Q. F. B. María de Jesús Muñoz Espinal

Agradecimientos

Gracias Señor por darme la vida, la salud, la fuerza y la firmeza para continuar adelante aún en los momentos más difíciles y tristes de mí existir, porque con tu ayuda pude cruzar barreras y alcanzar objetivos. **Gracias Señor** por estar siempre conmigo.

Agradezco y dedico esta tesis a mí madre Natalia Espinal González a quien admiro porque con su ejemplo me ha enseñado que a pesar de las dificultades y pérdidas que se presentan en la vida se debe continuar tomando decisiones y con firmeza y seguridad cumplir con los objetivos establecidos. Quiero agradecer su apoyo económico, moral y emocional, el cariño, comprensión y paciencia que me ha otorgado y sin los cuales difícilmente hubiese concluido la maestría. **Gracias** madre porque aún sin merecerlo siempre has estado conmigo.

Hace 7 años que mí padre falleció aparentemente no ha estado presente durante la realización de este proyecto sin embargo, de mí mente y corazón nunca se ha ido apoyándome como siempre lo hizo. La disciplina, responsabilidad y dedicación que inculcó en mí han sido herramientas básicas que me han permitido alcanzar este nuevo objetivo y aunque físicamente no está quiero decirle **Gracias Papá** por el amor con que me recibiste al nacer y el dolor con que me dejaste al fallecer. **Gracias** por tu cariño, educación, paciencia y comprensión que me permitieron alcanzar tantos objetivos por todo ello y por lo que me has dejado **Gracias Papá** porque tu amor y mí amor a pesar de la distancia no permitirá que nos separemos jamás.

Gracias a la **Dirección General de Estudios de Posgrado** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco a todos los maestros que conocí durante la maestría por obsequiarme parte de su conocimiento, tiempo, paciencia y amistad. **Agradezco** en especial a la maestra Inés Fuentes sus conocimientos y valiosa amistad.

Gracias a la Dra. Lilián Yépez por depositar su confianza en mí y darme la oportunidad de trabajar con ella.

Gracias a los integrantes del jurado: Dr. Rafael Castillo, Dr. Héctor Ponce, M en C. Baldomero Esquivel, M en C. Dinora Fabiola González, M en C. José Manuel Morales por su tiempo, sugerencias y recomendaciones que me permitieron concluir la presente investigación.

Agradezco al Dr. Fernando Calzada su valioso apoyo al permitirme utilizar el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución para realizar la cuantificación de las muestras obtenidas en los estudios de transporte.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION	3
III. OBJETIVOS	4
IV. HIPOTESIS	4
V. ANTECEDENTES	5
1. FISIOLOGIA GASTROINTESTINAL	6
2. BARRERAS EPITELIALES	10
3. ABSORCION GASTROINTESTINAL-CONSIDERACIONES FISICOQUIMICAS	16
4. METODOS DE ESTUDIO PARA LA INVESTIGACION DE LA ABSORCION INTESTINAL	19
5. EMPLEO DE BENCIMIDAZOLES EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES PARASITARIAS	25
6. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y ESTUDIOS DE ABSORCION GASTROINTESTINAL DEL ALBENDAZOL	27
7. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LOS 1-METILBENCIMIDAZOLES EN DIFERENTES MODELOS PARASITARIOS	32
VI. PARTE EXPERIMENTAL	
1. EQUIPOS Y MATERIALES	35
2. SOLUCIONES EMPLEADAS	37
3. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	38
4. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE DISTRIBUCION (LOG D) DEL ALBENDAZOL Y DE LOS COMPUESTOS DICLORADOS DERIVADOS DEL 1-METILBENCIMIDAZOL (13, 14 Y 15)	41
5. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA LINEA CELULAR CACO-2	41
6. ESTUDIOS DE TRANSPORTE CON LA LINEA CELULAR CACO-2	42
7. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD APARENTE (Papp) DE LOS COMPUESTOS DICLORADOS DERIVADOS DEL 1-METILBENCIMIDAZOL	45
VII. RESULTADOS	
1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	47
2. COEFICIENTES DE DISTRIBUCION (LOG D) Y DE PARTICION (LOG P)	59
3. ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD	60
4. COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD APARENTE (Papp)	68
5. CORRELACION ENTRE LOS COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD APARENTE (Papp) Y LOS COEFICIENTES DE DISTRIBUCION (LOGD) DE LOS COMPUESTOS DICLORADOS.	69

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS	70
IX. CONCLUSIONES	75
X. BIBLIOGRAFIA	76

INDICE DE TABLAS

1. Fármacos Empleados en el Tratamiento de Helminthiasis Humanas	25
2. 1-Metilbencimidazoles Diseñados con Posible Actividad Biológica	30
3. Susceptibilidad de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> a derivados del 1-metilbencimidazol	32
4. Porcentaje de reducción de la viabilidad del adulto y de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> utilizando los derivados del 1-metilbencimidazol	34
5. Coeficientes de distribución (log D) y de partición (log P) de los compuestos 13, 14 y 15 derivados del 1-metilbencimidazol y el albendazol	59
6. Propiedades fisicoquímicas determinadas de los compuestos 13, 14 y 15 derivados del 1-metilbencimidazol y el albendazol	59
7. Concentración obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 13	60
8. Concentración obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 13	60
9. Concentración obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 14	62
10. Concentración obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 14	62
11. Concentración obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 15	64
12. Concentración obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 15	64
13. Concentración promedio obtenida en el estudio de apical a basolateral para los compuestos 13, 14 y 15	66
14. Concentración promedio obtenida en el estudio de basolateral a apical para los compuestos 13, 14 y 15	67
15. Coeficiente de Permeabilidad Aparente (Papp) obtenido de los compuestos 13, 14 y 15	68

INDICE DE FIGURAS

1. Organización estructural de una vellosidad intestinal	7
2. El enterocito (célula de absorción)	8
3. Organización de la pared intestinal	9
4. Barreras del epitelio intestinal	10
5. Rutas para el transporte a través de las barreras celulares	12
6. Cromatograma del albendazol en solución transportadora de Hanks	49
7. Cromatograma del compuesto 13 en solución transportadora de Hanks	52
8. Cromatograma del compuesto 14 en solución transportadora de Hanks	55
9. Cromatograma del compuesto 15 en solución transportadora de Hanks	58
10. Cinética de absorción del compuesto 13 determinada del lado apical al basolateral	61
11. Cinética de absorción del compuesto 13 determinada del lado basolateral al apical	61
12. Cinética de absorción del compuesto 14 determinada del lado apical al basolateral	63
13. Cinética de absorción del compuesto 14 determinada del lado basolateral al apical	63
14. Cinética de absorción del compuesto 15 determinada del lado apical al basolateral	65
15. Cinética de absorción del compuesto 15 determinada del lado basolateral al apical	65
16. Cinética de absorción promedio de los compuestos 13, 14 y 15 determinada del estudio de apical a basolateral	66
17. Cinética de absorción promedio de los compuestos 13, 14 y 15 determinada del estudio de basolateral a apical	67
18. Correlación entre el coeficiente Papp y el coeficiente de distribución (log D) de los compuestos 13, 14 y 15	69

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias tanto las protozoosis como las helmintosis, siguen siendo un problema de salud pública en nuestro país y en muchas partes del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. Las infecciones por estos parásitos ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad y afectan principalmente a la población infantil (1).

La mayor parte de las helmintosis se circunscriben a la luz intestinal; sin embargo, algunas de ellas tienen diseminación sistemática y se alojan en diversos tejidos. Ejemplos de estas parasitosis son la fasciolosis, la cisticercosis y la trichinellosis, las cuales provocan en el hombre enfermedades que pueden llegar a ser graves e incluso fatales (2).

Con respecto al tratamiento de las helmintosis, los bencimidazol carbamatos y en especial el **albendazol** son los fármacos más ampliamente usados. A pesar de su uso generalizado, la eficacia de estos compuestos a nivel sistémico se ve limitada por su insolubilidad en agua lo que ocasiona poca absorción intestinal así como bajas y erráticas concentraciones en plasma y poca biodisponibilidad en tejidos (3,4,5,6).

Cuando un agente antiparasitario es administrado por vía oral, para poder ejercer un efecto terapéutico a nivel sistémico se necesita que las moléculas del fármaco difundan a través de una barrera fisiológica (membrana gastrointestinal) desde el sitio en que se depositó el medicamento hacia la sangre, a este fenómeno se le conoce como absorción y es un proceso complicado pues depende no solo de la liberación de la sustancia, sino también de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como son: pKa, peso molecular, coeficiente de partición, solubilidad, entre otras (7). Sin embargo, el hecho de que un fármaco sea absorbido no implica que ya esté disponible, pues existen otros procesos (unión a proteínas, metabolismo hepático, unión a tejidos, etc) que pueden determinar su biodisponibilidad.

Debido a la importancia del proceso de absorción en la biodisponibilidad de los fármacos que se administran por vía oral, su determinación se ha convertido en parte importante de la preformulación y selección de nuevas entidades farmacéuticas (8). En consecuencia, se han desarrollado una gran variedad de métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* para determinar la absorción intestinal: saco intestinal invertido, anillos intestinales, vesículas de la membrana del borde en cepillo, células mucosales aisladas, circuitos intestinales, son ejemplos de ellos. Sin embargo, cada sistema carece de versatilidad y/o viabilidad necesarias para imitar el comportamiento intacto de la mucosa intestinal (9).

La absorción de un fármaco a partir de una forma de dosificación oral depende entre otras cosas de su permeabilidad a través de la membrana gastrointestinal y en particular a través de la capa de células epiteliales, por ello, se ha considerado la posibilidad de usar monocapas de células del epitelio intestinal para estudiar la absorción pasiva de los fármacos *in vitro* (10).

Para ello, se dispone de la línea celular Caco-2, originaria de un carcinoma colorectal humano que a diferencia de otras líneas celulares del mismo origen se diferencia espontánea y permanentemente en monocapas de enterocitos polarizados bajo condiciones de cultivo celular convencionales. Después de 2 o 3 semanas en cultivo, las monocapas expresan varias hidrolasas del borde en cepillo y han desarrollado complejos de unión. Las monocapas tienen una resistencia eléctrica transepitelial de

aproximadamente $300\Omega \times \text{cm}^2$ similar a la del intestino grueso (10). Varios sistemas de transporte intestinal para diferentes moléculas como: aminoácidos neutros grandes, ácidos biliares, cobalamina y dipéptidos, han sido identificados empleando la línea Caco-2 (10).

Por todo esto, además de su simplicidad comparada con los estudios *in vivo* e *in situ* y por la buena correlación que ha sido mostrada entre los valores de coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y la absorción intestinal en humanos en varios estudios realizados (10,11,12), Caco-2 representa un modelo apropiado de sistema *in vitro* para investigar la permeabilidad a través del epitelio del intestino delgado de nuevas entidades farmacéuticas y presuponer su absorción *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, el **albendazol** es un fármaco de amplio espectro de acción antihelmíntica, cuya efectividad se ve limitada en infecciones sistémicas por su baja solubilidad y biodisponibilidad. Con la finalidad de disponer de fármacos con amplio espectro de acción antiparasitaria pero con mejores características de solubilidad que el **albendazol** se sintetizaron una nueva serie de moléculas derivadas del 1-metilbencimidazol. La actividad antihelmíntica de los 1-metilbencimidazoles se evaluó contra la fase enteral y parenteral del parásito *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*), mediante el método *in vitro* del MTT (sal de tetrazolio que se reduce a formazan ante la presencia de un agente reductor tal como las enzimas deshidrogenasas de células viables. La intensidad del color púrpura del formazan se puede medir espectrofotométricamente, presentandose una buena correlación entre el número de células viables y la densidad óptica). En este ensayo se demostró que los compuestos 1-metilbencimidazol clorados en posición 5 y 6, fueron particularmente efectivos contra la fase parenteral del parásito (6).

En base a estos resultados, fue de interés medir directamente la permeabilidad intestinal de 3 compuestos nuevos derivados del 1-metilbencimidazol con sustituyente cloro en posición 5 y 6 del anillo bencimidazólico y del **albendazol** como compuesto de referencia, empleando a Caco-2 como modelo biológico *in vitro*.

JUSTIFICACION

II. JUSTIFICACION

Con la finalidad de contar con fármacos de mayor solubilidad y biodisponibilidad que los bencimidazol carbamatos (en particular el **albendazol**) efectivos contra parasitosis intestinales y extraintestinales se diseñaron 4 series de compuestos derivados del 1-metilbencimidazol. Estos compuestos conservan el núcleo del bencimidazol y presentan un grupo metilo en posición 1, el cual ancla a la molécula y evita la formación de tautómeros, permitiendo realizar sustituciones en posición 5 y/o 6. En posición 2 se encuentran grupos isostéricos como son el NH₂, CH₃, SH y SCH₃ (Tabla 2).

Los resultados *in vitro* de la actividad biológica de estos compuestos mostraron que los compuestos de la serie D (diclorados en posición 5 y 6) fueron particularmente efectivos contra la larva muscular de *Trichinella spiralis* (fase parenteral), teniendo una actividad biológica semejante a la del **albendazol**.

Debido a que la eficacia de un compuesto contra parasitosis sistémicas, depende no únicamente de su solubilidad, sino además de su capacidad de absorción, lo cual se verá reflejado en una mayor biodisponibilidad, resulta de interés determinar la permeabilidad aparente de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol (compuestos **13**, **14** y **15** el compuesto **16** ya fue evaluado) empleando como modelo *in vitro* a la línea celular Caco-2. Esta determinación permitirá realizar una selección de los compuestos para su posterior evaluación *in vivo*.

OBJETIVOS
E
HIPOTESIS

III.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el Coeficiente de Permeabilidad Aparente (P_{app}) de los compuestos diclorados **13**, **14** y **15** derivados del 1-metilbencimidazol y del **albendazol** como compuesto de referencia, empleando como modelo biológico *in vitro* a la línea celular Caco-2 y su correlación con el coeficiente de distribución ($\log D$).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el método analítico (HPLC) para la cuantificación de los compuestos diclorados y del **albendazol**.
- Determinar el coeficiente de distribución ($\log D$) de los compuestos diclorados **13**, **14** y **15** y del **albendazol**.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos **13**, **14** y **15** y el **albendazol** utilizando a la línea celular Caco-2.
- Determinar la correlación entre el coeficiente de permeabilidad aparente y el coeficiente de distribución de los compuestos **13**, **14**, **15** y **albendazol**.

IV. HIPOTESIS

El coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol será mayor que el coeficiente de permeabilidad aparente del **albendazol**.

OBJETIVOS
E
HIPOTESIS

III.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el Coeficiente de Permeabilidad Aparente (Papp) de los compuestos diclorados **13**, **14** y **15** derivados del 1-metilbencimidazol y del **albendazol** como compuesto de referencia, empleando como modelo biológico *in vitro* a la línea celular Caco-2 y su correlación con el coeficiente de distribución (log D).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el método analítico (HPLC) para la cuantificación de los compuestos diclorados y del **albendazol**.
- Determinar el coeficiente de distribución (log D) de los compuestos diclorados **13**, **14** y **15** y del **albendazol**.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos **13**, **14** y **15** y el **albendazol** utilizando a la línea celular Caco-2.
- Determinar la correlación entre el coeficiente de permeabilidad aparente y el coeficiente de distribución de los compuestos **13**, **14**, **15** y **albendazol**.

IV. HIPOTESIS

El coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol será mayor que el coeficiente de permeabilidad aparente del **albendazol**.

ANTECEDENTES

V. ANTECEDENTES

Cuando un medicamento se administra por una vía distinta de la intravenosa será necesario que el principio activo sufra un proceso de absorción antes de llegar a la circulación sistémica y ejerza su efecto terapéutico en el sitio donde se requiere su acción.

Los fármacos comúnmente son administrados por la vía oral, de manera que el tracto gastrointestinal juega un papel importante en la velocidad y grado de absorción de un fármaco.

La barrera gastrointestinal que separa el lumen del estómago e intestinos de la circulación sistémica y los sitios de acción del fármaco es una estructura compleja compuesta de lípidos, proteínas, lipoproteínas y polisacáridos. La barrera tiene las características de una membrana semipermeable, permitiendo el rápido acceso de algunas sustancias, mientras que retarda o previene el paso de otras.

Las moléculas solubles en lípidos, así como pequeñas moléculas hidrofílicas e iones se absorben fácilmente a partir del tracto gastrointestinal en una forma aparentemente pasiva. Ciertas moléculas polares de mayor tamaño con pesos moleculares hasta de varios cientos también se absorben pero de manera que sugiere la participación activa de componentes de la membrana. Por consiguiente, la membrana biológica puede ser vista como un tamiz lipóideo dinámico, una membrana lipóidea semipermeable conteniendo numerosos poros acuosos o canales, y una multitud de moléculas acarreadoras.

Las moléculas solubles en lípidos penetran la membrana directamente a través de la porción lipoproteica. Los poros acuosos dan a las membranas epiteliales libre permeabilidad al agua, a iones monovalentes y a solutos hidrofílicos de tamaño molecular pequeño como la urea. Los acarreadores en la membrana transportan sustancias solubles en agua a través de los lípidos, quizá interactuando con el soluto para darle temporalmente solubilidad en las grasas.

El transporte de fármacos y otras sustancias directamente a través de los lípidos o canales acuosos es llamado difusión pasiva. La transferencia de moléculas polares mediada por acarreadores es llamada difusión facilitada o, en algunos casos, transporte activo.

La inmensa mayoría de los medicamentos de uso clínico son administrados oralmente y deben cruzar esta barrera antes de alcanzar la circulación sistémica y ejercer su efecto terapéutico en el sitio donde se requiere su acción. De aquí que las características de la barrera gastrointestinal son de considerable importancia en biofarmacia (13).

1. Fisiología Gastrointestinal.

Los principales componentes del tracto gastrointestinal son: el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon (13).

Estómago.

La superficie del estómago es bastante limitada porque carece de microvellosidades; además, las uniones entre las células epiteliales son firmes esto hace que el estómago sea un órgano de escasa absorción. Sin embargo, y a pesar de las características antes mencionadas ciertos medicamentos (especialmente ácidos débiles) se absorben bien en esta región. Así mismo, cantidades limitadas de algunas sustancias muy liposolubles como el alcohol pueden absorberse en pequeñas cantidades (14,15).

Intestino grueso o colon.

La superficie del colon al igual que la del estómago es bastante limitada porque carece de pliegues circulares y vellosidades, de manera tal que la mucosa tiene un aspecto liso; sus criptas tienen un mayor número de células caliciformes, en estas criptas al igual que en el resto del intestino hay una intensa actividad mitótica que permite la renovación del epitelio en pocos días. Además, la unión entre las células del epitelio del intestino grueso son mucho mas apretadas que las del intestino delgado.

El intestino grueso funciona como una zona de absorción para medicamentos que son tan lentamente absorbidos que una porción considerable de la dosis es capaz de sobrepasar el estómago e intestino delgado. Además, tiene gran capacidad para absorber activamente iones sodio; el potencial eléctrico creado por la absorción del sodio también provoca la absorción de cloruro. El colon también puede servir como zona de absorción para medicamentos administrados en formas retardadas (14, 15, 16).

Intestino delgado.

El intestino delgado es el sitio más importante para la absorción pasiva de los fármacos en el tracto gastrointestinal. La superficie de la mucosa donde la absorción puede tener lugar en el intestino delgado es extraordinariamente grande debido a la presencia de microvellosidades que aumentan casi tres veces la superficie de absorción de las células epiteliales. En consecuencia la superficie total de absorción es de unos 250m². El intestino delgado es también la región mas importante del tracto gastrointestinal con respecto al transporte mediado por acarreadores.

La función absorptiva del intestino delgado corre a cargo de las vellosidades intestinales y específicamente de los enterocitos (13, 14, 16).

Vellosidades Intestinales.

Las vellosidades intestinales son minúsculas prolongaciones digitiformes de la mucosa intestinal que se proyectan hacia la luz; están formadas por una capa de células denominadas enterocitos, lo que hace mas eficiente su función absorptiva. Además, la vellosidad contiene una porción central que es continuación de la lámina propia de

tejido conjuntivo. En la lámina propia corren los vasos sanguíneos arteriales y venosos (sistema vascular) para la absorción de líquidos y sustancias disueltas para ser transportadas a la vena porta. Los linfáticos que drenan a las vellosidades son abundantes y confluyen a un vaso central llamado quilífero, el cual permite la absorción hacia los linfáticos.

Entre las vellosidades están las criptas de Lieberkühn que son glándulas tubulares; su epitelio tiene células cilíndricas bajas, células caliciformes (secretoras de moco), células Paneth (secretan lisosima y anticuerpos) y células argentafines (secretan hormonas gastrointestinales). En el fondo de las criptas se pueden ver muchas de las células epiteliales en proceso de mitosis y en las puntas de las vellosidades las células que son descamadas a la luz intestinal. La función principal de las glándulas intestinales es servir a la constante reposición de células epiteliales para las vellosidades. En la figura 1 se presenta la organización estructural y funcional de una vellosidad intestinal (16,17).

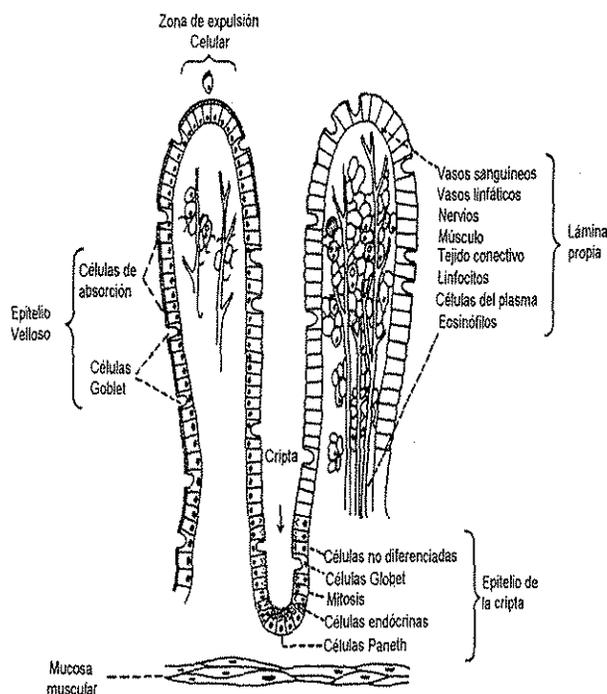


Figura 1. Organización estructural de una vellosidad intestinal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Células epiteliales (enterocitos).

Los enterocitos son células cilíndricas que poseen una membrana plasmática lipídica; su extremo libre adyacente a la luz del intestino (porción apical) está constituido por microvellosidades de la membrana plasmática que reciben el nombre de borde en cepillo y que contienen enzimas digestivas que terminan el proceso de digestión y facilitan la absorción. Además, entre los enterocitos se encuentran las células caliciformes productoras de moco. Cerca del borde en cepillo de la célula epitelial se encuentran muchas mitocondrias que suministran a la célula la energía oxidativa necesaria para el transporte activo de sustancias a través del epitelio intestinal.

Cada célula epitelial está unida a su vecina cerca de la superficie apical por estructuras conocidas como uniones estrechas. Las células epiteliales sirven como barrera entre los compartimentos luminal y tisular de manera que son la principal barrera para la absorción de los fármacos administrados oralmente (Figura 2) (14, 16, 18).

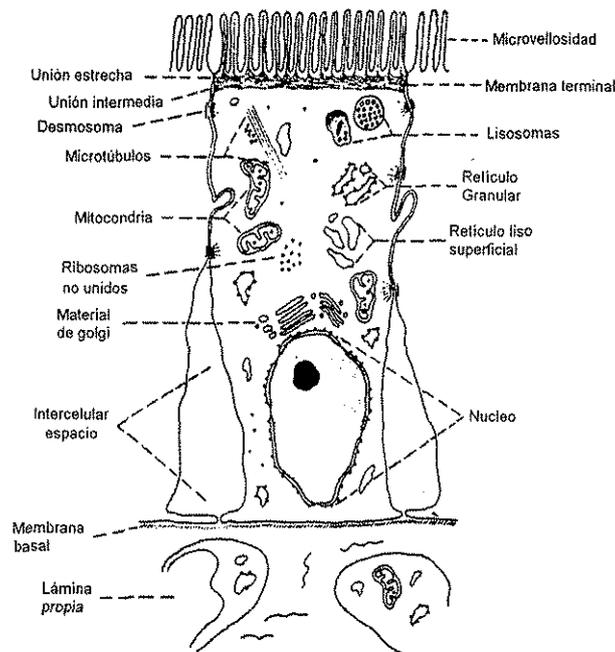


Figura 2. El enterocito

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Organización de la pared intestinal.

La pared intestinal consiste de 4 capas: la mucosa, la submucosa, la muscularis propia y una capa serosa o adventita. La mucosa consiste del epitelio superficial, una capa subyacente de tejido conectivo ancho que contiene nervios y vasos (lámina propia) y una capa delgada de músculo liso (mucosa muscular). La mucosa también contiene un arreglo de linfocitos, macrófagos y en estados de enfermedad, leucocitos polimorfonucleares, todos estos constituyentes son capaces de regular la función epitelial. La mucosa es soportada por una capa subyacente de tejido fibroconectivo llamada submucosa. La submucosa contiene nervios, vasos linfáticos, que llegan a la mucosa. La submucosa, descansa sobre la muscularis propia, la cual está compuesta de dos, y algunas veces de tres capas. En muchos casos, los órganos están revestidos por una delicada capa de tejido fibrograso, la cual soporta una capa continua de células mesoteliales (serosa). En la figura 3 se describe esquemáticamente a los componentes de la pared intestinal (18).

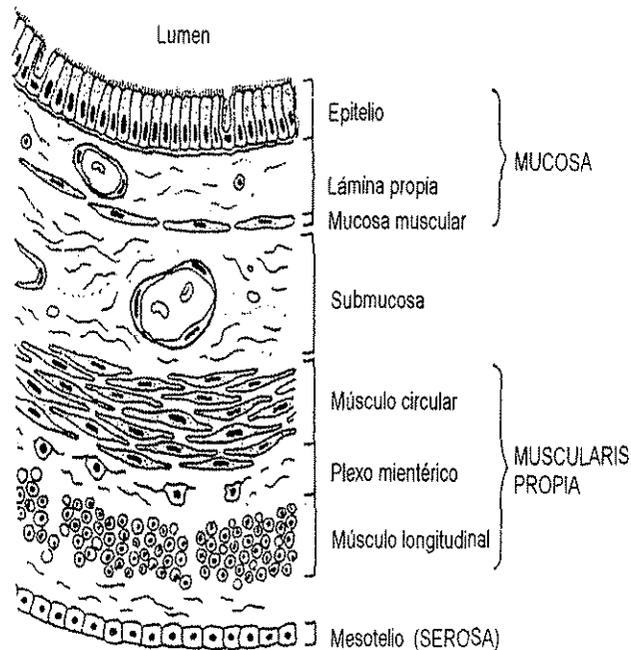
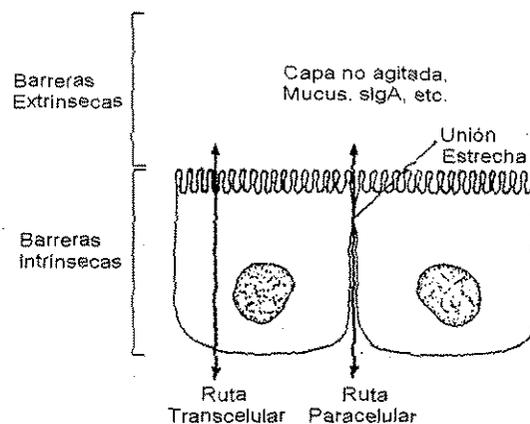


Figura 3. Organización de la pared intestinal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Barreras Epiteliales.

Las barreras epiteliales se dividen en dos categorías principales: las Barreras Extrínsecas y las Barreras Intrínsecas (Figura 4).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Barreras del epitelio intestinal

I. Barreras Extrínsecas.

A continuación se presentan algunos de los factores biológicos que influyen en la absorción de los fármacos.

Moco (Mucina)

Las superficies mucosas del estómago y del intestino están cubiertas por una fina capa de un muco-polisacárido viscoso denominado mucina. La alta viscosidad de la mucina sugiere, que puede actuar como una barrera de difusión para la absorción, y por ello disminuir la velocidad de la absorción. La mucina también es capaz de interactuar con ciertos medicamentos e inhibir su absorción. Amplias investigaciones han demostrado que el mucus intestinal inhibe la absorción de compuestos de amonio cuaternario por formación de complejos no absorbibles (15).

Capa No Agitada: Una Barrera de Significado Fisiológico Desconocido.

El contenido luminal del tracto gastrointestinal es principalmente agua y, por lo tanto, representa una "fase acuosa". La absorción óptima de un compuesto requiere más que su dispersión en los contenidos luminales, como puede ocurrir con la mezcla. El fármaco debe estar disuelto en la fase acuosa. La velocidad de flujo de los contenidos luminales disminuye cuando un fármaco se dirige a la superficie mucosal, formando una capa acuosa estacionaria adyacente al borde microvellosa de los enterocitos, llamada la "capa acuosa no agitada". El grosor de la capa en el intestino delgado ha sido estimado en varios cientos de micrómetros (300-800 μ m). La capa no agitada, es particularmente

importante para fármacos que penetran la barrera rápidamente, que están disueltos en la fase acuosa y difunden pasivamente a través de esta capa. Debido al movimiento propulsivo del tracto intestinal, el lumen puede ser más que turbulento, lo cual resulta en la mezcla de los contenidos lumbinales y tiende a destruir la capa de agua no agitada. Por otro lado, el tracto gastrointestinal contiene una capa de moco que lógicamente impide la mezcla y promueve el mantenimiento de la capa de agua no agitada. El efecto de esta capa en la absorción de moléculas con coeficientes de permeabilidad de varios órdenes de magnitud menores en agua que a través de membranas lipídicas, debe de considerarse (18).

pH gastrointestinal.

El pH en el sitio de absorción es un factor importante en la absorción del fármaco debido a que muchos fármacos son ácidos o bases débiles orgánicos. En solución existen electrolitos orgánicos en forma no ionizada (usualmente liposoluble) y ionizada (usualmente pobremente soluble en lípidos). La fracción de cada especie depende del pH de la solución. Ya que la barrera gastrointestinal es mucho más permeable a solutos no cargados solubles en lípidos, un fármaco puede ser bien absorbido a partir de un segmento del tracto gastrointestinal, donde existe un pH favorable. La absorción de fármacos débilmente básicos se favorece en el intestino delgado donde existen ampliamente en la forma no ionizada. Por otro lado, los fluidos gástricos ácidos tienden a retardar la absorción de bases débiles pero promueve la absorción de fármacos débilmente ácidos. Los cambios en el pH de los fluidos en un segmento dado del tracto pueden mejorar o impedir la absorción de un fármaco.

El pH del fluido gástrico varía considerablemente: el ayuno tiende a disminuir el pH de los fluidos gástricos. La enfermedad también puede influenciar el pH del estómago. Algunos fármacos también pueden modificar el pH, tal es el caso de los antiácidos que son ampliamente usados para neutralizar la acidez gástrica y elevar el pH de los contenidos gástricos. Los cambios en el pH gástrico relacionados con enfermedad o fármacos pueden influenciar la disolución, estabilidad y/o absorción de ciertos fármacos (13, 19, 20).

Flujo Sanguíneo Gastrointestinal.

La sangre que perfunde al tracto gastrointestinal juega un papel importante en la absorción del fármaco ya que continuamente mantiene el gradiente de concentración a través de la membrana epitelial. La dependencia de la absorción intestinal con la velocidad de flujo sanguíneo varía desde independiente a limitada. Moléculas polares que son absorbidas lentamente no muestran dependencia del flujo sanguíneo; la absorción de moléculas solubles en lípidos y moléculas que son pequeñas y penetran fácilmente los poros acuosos es rápida y altamente dependiente de la velocidad de flujo sanguíneo. La velocidad de absorción de muchos fármacos probablemente muestra una dependencia intermedia de la velocidad de flujo sanguíneo. La sangre que drena a la gran parte del tracto gastrointestinal regresa a la circulación sistémica por medio del hígado. Por lo tanto, la dosis total de un fármaco que es administrado oralmente y completamente absorbida está expuesta al hígado antes de alcanzar la circulación sistémica. Como el hígado es el órgano más importante en el cuerpo para el

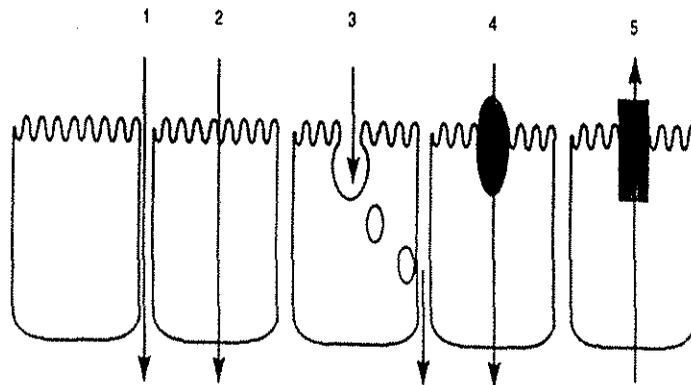
metabolismo de los fármacos y metaboliza a algunos rápidamente, existe la posibilidad de que una gran fracción de la dosis nunca llegue a la circulación sistémica debido al metabolismo hepático durante la absorción. Este fenómeno se conoce como efecto de primer paso hepático y es responsable de la incompleta biodisponibilidad de muchos fármacos administrados oralmente. El metabolismo de un fármaco durante el proceso de absorción, por las enzimas que se encuentran en la pared intestinal también reduce su biodisponibilidad (13, 20).

II. Barreras Intrínsecas: El Epitelio.

Los fármacos pueden pasar la barrera epitelial por alguna de dos rutas:

- a. **Paracelular:** Esta ruta implica el movimiento de la sustancia a través de los espacios intercelulares y representa la principal vía de acceso para muchos fármacos hidrofílicos. No obstante, esta ruta ocupa un área superficial muy pequeña comparada con la membrana celular de manera que su contribución a la permeabilidad total de la monocapa epitelial sólo es significativa para fármacos que son transportados lentamente a través de la membrana celular (compuestos que tienen muy bajo coeficiente de partición de membrana) (18) (Figura 5).
- b. **Transcelular:** Esta ruta implica el movimiento de la sustancia a través de las membranas celulares y representa la principal vía de acceso para muchos fármacos relativamente lipofílicos que se particionan rápidamente desde el fluido luminal hacia las membranas celulares y que normalmente se absorben por completo desde el tracto gastrointestinal (18) (Figura 5).

Apical



Basolateral

1, Paracelular; 2, Difusión transcelular pasiva; 3, Transcitosis; 4, Captación mediada por transportadores; 5, Eflujo mediado por transportadores.

Figura 5. Rutas para el transporte a través de las barreras celulares

Ruta Paracelular: Una Ruta Principal Para La Permeacion Pasiva de Solutos.

Algunos fármacos clínicamente útiles permanecen ionizados en todo el rango de pH encontrado a lo largo del tracto gastrointestinal (son electrolitos fuertes). Para que estos iones se absorban, deben atravesar la monocapa de enterocitos a través de espacios en las uniones intercelulares. (ruta paracelular). Las uniones estrechas son la barrera limitante que restringe el movimiento pasivo de solutos hidrofóbicos a través del espacio paracelular. Sin embargo, las uniones estrechas no están perfectamente cerradas sino que tienen varios grados de permeabilidad a iones dependiendo de la localización del epitelio. Las uniones intercelulares en el intestino delgado son bastante permeables a los iones comparadas con las presentes en el colon y otros tejidos. Estudios de las uniones estrechas sugieren que los iones pasan a través de canales. En algunos casos, los cationes parecen atravesar las uniones más fácilmente que aniones de tamaño idéntico, sugiriendo que el area que rodea a las uniones estrechas posee una carga negativa.

Aunque muchos fármacos tienen diámetros menores que las dimensiones estimadas de los canales de las uniones estrechas presentes en el intestino delgado, por el hecho de estar ionizados se encuentran hidratados incrementándose grandemente su tamaño efectivo y limitando su acceso por la ruta paracelular. Por lo tanto, quizá muchas moléculas ionizadas se absorben hacia el cuerpo atravesando la membrana apical del enterocito y no por la ruta paracelular.

El movimiento del agua a través del epitelio gastrointestinal ocurre pasivamente a través de la unión estrecha de acuerdo a un gradiente de concentración; es decir, desde una región de mayor concentración a una de menor concentración.

El transporte pasivo es descrito por la primera ley de Fick's, la cual establece que la velocidad de difusión a través de una membrana (dC/dt) es proporcional a la diferencia en la concentración del fármaco en cada lado de la membrana (ΔC), esto es:

$$-dC/dt = k \Delta C = k(C_1 - C_2)$$

donde C_1 y C_2 son las concentraciones del fármaco en cada lado de la membrana y k es una constante de proporcionalidad. Se asume que $C_1 > C_2$ y que hay transporte neto del fármaco desde la región 1 a la región 2. La constante de proporcionalidad incorpora el coeficiente de difusión del fármaco, el grosor y area de la membrana biológica y la permeabilidad de la membrana para el fármaco específico. La absorción gastrointestinal de un fármaco desde una solución acuosa requiere difusión en el lumen hacia la pared intestinal y penetración de la barrera epitelial a los capilares de la circulación sistémica. Una vez que emerge en la sangre, el fármaco se distribuye rápidamente dentro de un volumen aparente que usualmente es considerablemente más grande que el volumen de la sangre. Por lo tanto, durante la absorción, la concentración del fármaco en la sangre será mucho menor que en el sitio de absorción. En consecuencia, el gradiente de concentración es aproximadamente igual a C_1 y la ecuación 1 puede ser escrita:

$$-dC/dt \cong kC_1$$

la cual es la forma familiar de una ecuación de velocidad de primer orden. La absorción gastrointestinal de muchos fármacos a partir de una solución puede ser descrita por

cinética de primer orden; la velocidad de absorción es proporcional a la concentración del fármaco a través de un amplio rango de concentración indicando absorción pasiva.

Además del agua, moléculas pequeñas de peso molecular menor a 300 y electrolitos que no son transportados activamente también se pueden mover a través de la unión estrecha. Por lo tanto, la unión estrecha, es la ruta para el movimiento neto de aquellas sustancias que no son transportadas activamente para mantener el balance osmótico y eléctrico.

En general, la permeabilidad de las uniones estrechas disminuye distalmente a través del intestino. Por lo tanto el intestino superior es significativamente más permeable que el colon al movimiento pasivo de fluidos y electrolitos (18, 15, 21).

Ruta Transcelular: Una Ruta Altamente Restrictiva Para el Flujo Pasivo de Solutos.

Para difundir pasivamente a través de una célula, un ión u otro soluto hidrofílico debe interactuar con tres barreras en serie: la membrana apical, el citosol y la membrana basolateral.

Todas las células epiteliales están revestidas por una membrana plasmática, que es la principal barrera que aísla el interior celular del medio ambiente. Como otras membranas biológicas, la membrana plasmática consiste de una bicapa lipídica. Las bicapas lipídicas restringen severamente la permeación de solutos hidrofílicos y tienden a preservar los gradientes iónicos transmembranas.

Las membranas biológicas (bicapas lipídicas más proteínas de la membrana integral) también tienen resistencias que son muy restrictivas al flujo pasivo de iones, aunque menores que las bicapas del modelo lipídico (10^3 a $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$.) El responsable principal del movimiento iónico a través de las membranas biológicas parece ser debido a las proteínas de la membrana integral, presumiblemente transportadores y canales. En ausencia de rutas de transporte específico, las membranas biológicas intactas pueden ser consideradas virtualmente impermeables a solutos hidrofílicos de 5 nm o mayor tamaño. En contraste a los solutos hidrofílicos, las moléculas hidrofóbicas fácilmente permean la bicapa lipídica.

Otra barrera además de las dos membranas plasmáticas (apical y basolateral) para restringir la permeación pasiva transcelular es el citosol. Debido a que el citosol tiene las características de un gel hidratado, es probable que la resistencia proporcionada por esta barrera es solo marginalmente mayor que la de la solución libre

Hay grandes diferencias entre la composición de las membranas apical y basolateral de los enterocitos. Por ejemplo, la membrana apical es significativamente menos fluida que la membrana basolateral. Los mecanismos involucrados en la migración transcelular de los fármacos durante la absorción no se conocen bien. La captación a partir del lumen puede involucrar la simple disolución de fármacos solubles en lípidos dentro de la membrana apical. Alternativamente, pueden existir poros en la membrana apical que permiten el paso de moléculas pequeñas hacia el enterocito. Además, existen muchos mecanismos de transporte selectivo en la membrana apical que pueden ser usados por los fármacos. Así, tenemos que cierto número de compuestos de interés terapéutico se absorben por medio de un mecanismo de transporte activo; es decir, por un proceso donde las sustancias pueden ser transportadas contra un gradiente de concentración; lo cual significa que la difusión ocurre desde una región de menor

concentración a una de mayor concentración. Aún cuando el mecanismo de absorción activa no se ha dilucidado, pudiera ser que alguna molécula “portadora” (sea una enzima o cualquier otro componente de la mucosa) fuese capaz de recoger una molécula de soluto de la superficie de la membrana gastrointestinal, transportándola a través de la membrana y liberándola en la superficie serosa (zona sanguínea) de la membrana. El portador entonces vuelve a la superficie de la mucosa para recoger a otra molécula de soluto. Este difícil transporte ocurre solamente en la dirección mucosa-serosa. Una característica de este proceso de transporte es que la cantidad de material portador está limitada. De manera que a determinada concentración del medicamento en la zona de absorción, el sistema de transporte llega a ser saturado. La absorción activa tiene lugar a una velocidad proporcional a la concentración del medicamento, solamente hasta cierta concentración. Después, la concentración es lo suficientemente alta para saturar el sistema de transporte y el posterior aumento en la concentración no ejercerá efecto sobre la velocidad de absorción. La velocidad de absorción de un producto que es activamente transportado, tiene una dependencia lineal de la concentración, solamente a concentraciones bajas. A concentraciones más elevadas la pendiente de la curva disminuye y se hace invariable con respecto a la concentración. La región de la meseta refleja la saturación del mecanismo de transporte.

Los diversos sistemas de transporte activo cuya existencia en el sistema gastrointestinal se conocen parecen ser altamente específicos para una estructura química en particular. Además de la especificidad estructural, existe un cierto grado de especificidad de zona. También se ha observado la competición entre dos solutos similares para un mismo mecanismo de transporte, con la consiguiente inhibición de la absorción de uno o de ambos solutos. La inhibición de la absorción activa también puede ser producida por ciertos agentes no específicos.

Algunos sustratos y fármacos naturales se absorben por procesos simultáneos de transporte activo y difusión pasiva. La contribución de cada proceso a la absorción total varía con la concentración. A bajas concentraciones del medicamento en la zona de absorción, el transporte activo tiene lugar generalmente a una velocidad mucho mayor que la de la difusión pasiva. La contribución del proceso de la difusión pasiva llega a ser importante, a concentraciones que sean lo suficientemente altas, como para saturar los procesos de transporte activo.

Se ha mostrado que la membrana apical contiene sistemas de transporte que aparentemente bombean hacia el lumen intestinal sustancias que están presentes en el enterocito. Esto es posible por los mecanismos de transporte que trabajan en “reversa”.

Una vez que cruzan la membrana apical muchos fármacos parecen alcanzar la superficie basolateral del enterocito por medio del citosol. Los ácidos débiles se disocian después de atravesar la membrana apical como resultado del pH neutro del citosol, y los iones resultantes pueden ser suficientemente solubles en agua para difundir a la membrana basolateral. Sin embargo, los fármacos solubles en lípidos atraviesan el enterocito, presumiblemente por su unión a proteínas citosólicas solubles (18, 15, 21, 22).

3. Absorción Gastrointestinal-Consideraciones Físicoquímicas.

La absorción de un fármaco está influenciada por muchos factores fisiológicos, pero también depende de la solubilidad, tamaño de partícula, lipofilidad, pKa, etc. Diferencias clínicamente significantes en la absorción de fármacos estrechamente relacionados, son el resultado de diferencias en las propiedades físicoquímicas.

La constante de disociación y solubilidad lipídica de un fármaco, así como el pH en el sitio de absorción, determinan las características de absorción de un fármaco a partir de la solución. La interrelación entre estos parámetros es conocida como la teoría pH-partición de la absorción del fármaco. Esta teoría se basa en el supuesto de que el tracto gastrointestinal es una simple barrera de lípidos para el transporte de fármacos y sustancias. Por consiguiente, la forma no ionizada de un fármaco ácido o básico, si es suficientemente soluble en lípidos, es absorbida, pero la forma ionizada no lo es. Entre mayor sea la fracción de la forma no ionizada en un sitio de absorción específico, la absorción será más rápida. La velocidad de absorción está relacionada con el coeficiente de partición lípido/agua de un fármaco: los compuestos más lipofílicos se absorberán más rápidamente (13, 23).

pka del fármaco y pH gastrointestinal.

La fracción de fármaco en solución que existe en la forma no ionizada es función de la constante de disociación del fármaco y del pH de la solución. La constante de disociación a menudo es expresada para ácidos y bases como pka. La relación entre pH y pka, y el grado de ionización es dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{para un ácido} \quad \text{pka} - \text{pH} = \log(f_u/f_i)$$

$$\text{para una base} \quad \text{pka} - \text{pH} = \log(f_i/f_u)$$

donde f_u y f_i son las fracciones de la forma no ionizada y ionizada del fármaco respectivamente.

Muchos fármacos ácidos están predominantemente no ionizados en el bajo pH de los fluidos gástricos y pueden ser absorbidos a partir del estómago así como a partir de los intestinos. El intervalo de pH encontrado en el tracto gastrointestinal desde el estómago al colon es alrededor de 1 a 8. Muchos ácidos débiles ($\text{pka} > 8$) esencialmente están no ionizados a través del tracto gastrointestinal. La ionización de ácidos débiles con valores de pka oscilando desde 2.5 a 7.5 es sensible a cambios en el pH. Muchos ácidos débiles en los fluidos del intestino delgado (pH 6.5) presentan una relación fármaco no ionizado/fármaco ionizado no favorable, no obstante, estos compuestos se absorben bien en el intestino delgado. Una área superficial grande y un tiempo de residencia relativamente largo en el intestino delgado son factores que contribuyen a su absorción. Estos factores minimizan la necesidad de tener una gran fracción de la forma no ionizada del fármaco en el intestino delgado. Los ácidos fuertes están ionizados a través del tracto gastrointestinal y se absorben pobremente. Muchas bases débiles se absorben pobremente en el estómago ya que están ampliamente ionizadas a pH bajo. El intervalo de pH de los intestinos desde el duodeno al colon es alrededor de 5 a 8. Fármacos débilmente básicos ($\text{pka} < 5$) esencialmente están no ionizados a través de los

intestinos. Las bases fuertes están ionizadas a través del tracto gastrointestinal y tienden a ser pobremente absorbidas (13, 23).

Solubilidad lipídica.

La difusión a través de la fase lipídica de las membranas es la ruta más importante para la absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal. Quizá, la solubilidad en lípidos es la propiedad más importante para la evaluación de la absorción de los fármacos. Ciertos fármacos se pueden absorber pobremente después de su administración oral aún cuando estén ampliamente no ionizados en el intestino delgado. La baja solubilidad en lípidos de la molécula sin carga puede ser la razón. El papel crítico de la solubilidad lipídica en la absorción del fármaco es una guía en el desarrollo de fármacos.

Sin embargo, durante la absorción a partir del lumen intestinal un fármaco tiene que pasar ambos medios: el acuoso y el lipídico. Por lo tanto, el prerrequisito para que un fármaco sea fácilmente absorbido es una óptima relación entre la solubilidad en lípidos y en agua más que sólo solubilidad en lípidos. Un incremento en la solubilidad lipídica mas allá de una relación óptima no se acompaña por un incremento en la velocidad de absorción. El dicumarol por ejemplo, a pesar de su alta solubilidad en lípidos se absorbe muy poco; la razón puede ser su muy baja solubilidad en agua.

Cuando al pasar una sustancia por una membrana (soluble en lípidos), se acumula dentro de la fase lipídica de la membrana, esto influencia la cinética de absorción. La absorción de una sustancia soluble en lípidos se puede describir en términos de un proceso biexponencial mientras que la absorción de una sustancia insoluble en lípidos, no acumulable sigue una función monoexponencial.

Por otro lado, la velocidad de permeación de un fármaco que cruza la fase lipídica de una membrana es menor cuando el número de grupos polares de una molécula incrementa.

Composición de la membrana; modelos de partición.

La velocidad de difusión depende del coeficiente de partición de la sustancia que difunde entre el material de la membrana y el fluido de los alrededores. Por lo tanto, la composición lipídica de la membrana es un factor importante para la difusión. El análisis de los lípidos a partir de las membranas microvellosas de la rata mostró una gran variedad de lípidos químicamente diferentes. El coeficiente de partición de un fármaco ha sido determinado usando modelos de sistemas de partición en los cuales los lípidos de la membrana son remplazados por solventes orgánicos los cuales solo son parcialmente miscibles con el agua. Sin embargo, no hay una clara correlación entre el coeficiente de partición y la velocidad de absorción. La correlación depende del solvente orgánico seleccionado. Desafortunadamente, para evaluar la absorción de los fármacos en el intestino delgado ningún solvente orgánico especial puede ser recomendado. En el caso de la determinación de la absorción de los fármacos a partir del estómago se recomienda la determinación del coeficiente de partición entre el agua e hidrocarburos simples o clorados (éter de petróleo, benceno, cloroformo, etc).

La falta de consistencia entre el coeficiente de partición y la velocidad de absorción puede ser explicada por el hecho de que los substitutos usados en los modelos

de partición posiblemente son similares pero no son los mismos lípidos de la membrana o que un solvente inadecuado como cloroformo es usado cuyos productos de degradación pueden reaccionar rápidamente con bases orgánicas. Sin embargo, es difícil decidir si la inconsistencia solo es debida a las diferencias en las propiedades del solvente orgánico y los lípidos de la membrana o si otros factores prevalecen y ocultan la dependencia de la absorción intestinal sobre la solubilidad lipídica de los fármacos. Otra explicación puede ser el hecho de que el coeficiente de partición se refiere a un estado de equilibrio, mientras que la absorción del fármaco a partir del tracto gastrointestinal es un proceso dinámico.

El resultado principal de esas consideraciones es que los estudios de partición por sí mismos predicen la absorción del fármaco pobremente. La razón es obvia; el epitelio mucosal puede tener algunas propiedades en común con una simple membrana lipídica, pero está compuesto de una monocapa de células las cuales en toda su longitud, aún son "cajas negras" hasta el destino de los fármacos. La unión de los fármacos a constituyentes celulares, (por ejemplo proteínas) y partición de los fármacos entre varios compartimentos celulares puede interferir con los procesos de transferencia a través de la membrana (24).

Estabilidad del Fármaco e Hidrólisis en el Tracto Gastrointestinal.

La hidrólisis ácida y enzimática de los fármacos en el tracto gastrointestinal es algunas veces la razón de la pobre biodisponibilidad. La hidrólisis e inactivación de la penicilina G en el estómago es un ejemplo. La vida media de degradación de la penicilina G es menor a 1 minuto a pH de 1 y alrededor de 9 minutos a pH de 2.

Cuando un fármaco es inestable en los líquidos ácidos del estómago una rápida disolución puede reducir su biodisponibilidad fisiológica. Sin embargo, ciertos profármacos deben ser hidrolizados al fármaco principal en los fluidos gastrointestinales para producir el efecto clínico esperado. El clorazepato es convertido rápidamente al ansiolítico nordiazepam a pH bajo. El único sitio para su conversión efectiva es el fluido gástrico. La absorción del profármaco evita su total conversión al fármaco patrón de manera que si tiene algún efecto tranquilizador (profármaco) este es mínimo (13).

4. Métodos de estudio para la Investigación de la Absorción Intestinal.

Los métodos mas comúnmente usados y adecuados para estudiar la absorción intestinal de los fármacos se clasifican en dos grandes categorías: Métodos *in vivo* y Métodos *in vitro*.

I. Métodos *in vivo*.

Los métodos *in vivo* miden la aparición de un agente dado en los compartimentos corporales o fluidos especialmente sangre y orina después de la administración oral y/o miden la desaparición de un agente dado a partir del tracto gastrointestinal

Los dos métodos más ampliamente usados en estudios con animales son modificaciones de los métodos de perfusión y de asa cerrada . Aunque el método de perfusión ha sido usado en algunos estudios de absorción de fármacos en realidad tiene algunas desventajas notables ya que es necesario contar con un equipo externo para asegurar la circulación o recirculación del fluido de perfusión y mantener al animal y al fluido calientes. Además, se requiere que el animal esté anestesiado; pero quizá el inconveniente más serio de esta técnica es que mide la desaparición de un agente dado a partir del tracto gastrointestinal considerando que el fármaco que desaparece es totalmente absorbido, sin contemplar que parte del mismo se puede unir al tejido intestinal, quedar atrapado en el interior celular, etc. Debido a que la absorción es un proceso de movimiento de una sustancia desde el lumen del intestino hacia la sangre o capilares linfáticos, será necesario que en la técnica de perfusión se tome en cuenta la cantidad del fármaco adsorbido en el tejido intestinal o contenido dentro de las paredes del intestino para que se considere una medida real de la cantidad absorbida (25).

El método de asa cerrada reduce los problemas asociados con el método de perfusión. Este método se puede aplicar en animales grandes y pequeños para lo cual se requiere administrar intraperitonealmente un anestésico adecuado de acción larga . Cuando se utilizan animales de mayor tamaño se requiere utilizar mezclas de anestésicos, además del uso de un vaporizador convencional. Con un diseño apropiado esta técnica puede ser usado para estudiar la velocidad, el grado así como los mecanismos de absorción lo más cercano a lo fisiológico. La orientación anatómica exacta es esencial ya que únicamente los segmentos homólogos pueden ser comparados ; la variabilidad debida a los procedimientos experimentales puede ser minimizada cuando la localización y el tamaño del segmento o segmentos intestinales son cuidadosamente controlados. Ningún vaso sanguíneo o linfático principal debe ser ocluído por las ligaduras. El volumen de fluido introducido en el segmento intestinal debe ser de acuerdo a la capacidad del segmento, además, debe ser suficiente para permitir que toda la superficie de la mucosa esté en contacto con el fluido. La concentración de la sustancia que será investigada puede cambiar considerablemente durante el período de prueba debido a la absorción de agua, particularmente en el caso de la absorción lenta de la sustancia. El fármaco bajo estudio debe ser administrado dentro del segmento predeterminado sin puncionar la pared intestinal entre las ligaduras.

La cantidad de un fármaco que queda en una asa intestinal al final de un experimento puede ser una medida de la cantidad total que se absorbe solo después de

que ciertas precauciones adicionales han sido tomadas. Antes de iniciar los estudios de absorción se debe determinar que no existe pérdida de la sustancia de prueba como resultado de interacciones enzimáticas o químicas dentro del tejido intestinal. Al final del experimento la cantidad del material de prueba que queda en el segmento intestinal total (por ejemplo pared intestinal y contenidos intraluminales) debe ser determinada con el fin de establecer que la diferencia entre la dosis administrada y esta cantidad representa la cantidad absorbida; cualquier fármaco contenido en el tejido intestinal no se puede considerar como absorbido (25, 26).

La investigación con segmentos intestinales cerrados tiene las siguientes ventajas (13, 15):

1. La absorción puede ser investigada independientemente del tiempo de vaciamiento estomacal o del tiempo de paso a través del intestino.
2. Es posible comparar diferentes secciones del tracto gastrointestinal.
3. Es posible, si es necesario, evitar o investigar interferencia de la circulación entero-hepática.

II. Métodos *in vitro*.

La elaboración de diversas técnicas *in vitro* ha aumentado considerablemente los conocimientos sobre la absorción intestinal en los últimos años. En las investigaciones *in vitro* las preparaciones no están sujetas al flujo sanguíneo, de manera que la situación llega a ser excepcionalmente clara y las muestras para el análisis son fáciles de obtener. Además, las preparaciones dependen del mantenimiento de su vitalidad para lo cual, en muchos casos se les mantiene en contacto con un líquido oxigenado de una composición adecuada. Ya que la medida de transporte solo se puede realizar cuando el soluto permanece en su estado inicial a través de los procesos de transferencia, cualquier unión del soluto a componentes tisulares puede ser una considerable fuente de error en los métodos *in vitro* los cuales intentan definir mecanismos de transporte por técnicas de acumulación tisular o medida de la capacidad absorbente por transferencia desde el lado mucosal al lado serosal. En el último tipo de estudio la acumulación del soluto así como del solvente dentro del tejido puede ser una fuente adicional de error conduciendo a conclusiones inapropiadas. Las ventajas relativas de cada método surgen de su habilidad para excluir ciertos factores que confunden, por ejemplo en el intestino aislado despojado de las capas musculares se excluyen los efectos del flujo sanguíneo y motilidad; los enterocitos aislados excluyen la influencia de péptidos o neurotransmisores preexistentes y las membranas apicales o basolaterales purificadas permiten la identificación de rutas de transporte en cualquiera de los dos lados de la membrana plasmática. A continuación se presentan las características de los métodos *in vitro* mas comúnmente usados (25, 27).

Saco intestinal invertido.

Esta simple técnica permite la estimación a groso modo de las funciones secretivas o absorbentes. En este procedimiento pequeños segmentos del intestino son evertidos, ocupados con un fluido y cerrados en ambos extremos; además, los segmentos son suspendidos en la misma solución que ocupa el interior del saco intestinal. Esta eversión permite la adecuada oxigenación de la superficie mucosal y

elimina el elaborado aparato necesario para circular fluido a través del lumen. La preparación retiene mucho de la estructura normal intestinal incluyendo células reguladoras nucleares. Se asume que el fluido y soluto aparecen en el lado serosal por difusión desde el espacio intersticial y tejidos subepiteliales después de moverse desde el lado mucosal dentro y fuera de la célula epitelial; por lo tanto, las concentraciones del material que aparecen en el lado serosal se interpretan como una reflexión del mecanismo por el cual el material abandona o es expulsado de la célula epitelial. Un problema potencial es que solo aquellas sustancias absorbidas capaces de penetrar las capas musculares y la serosa pueden ser detectadas por esta técnica. Una considerable dilatación e hidratación de los segmentos intestinales ocurre durante el período experimental, este incremento en el agua tisular puede afectar la interpretación de los datos por lo que se ha tomado en cuenta en el cálculo de transferencia neta. Además, se reportó que la integridad estructural de la preparación desaparece después de 1 hora de incubación a 37°C (18, 25, 26, 28).

Captación de radionucleótidos y estudios de eflujo en células aisladas.

La captación de un radionucleótido dentro de las células o eflujo fuera de las células se puede estudiar por el uso de enterocitos aislados. La técnica puede verificar si está presente un mecanismo de cotransporte o intercambio iónico, también puede detectar fácilmente un canal iónico, sin embargo, el método no puede diferenciar directamente un canal de un transportador; también se puede probar la activación o inhibición de estas rutas por péptidos (18).

Vesículas de la membrana.

Las membranas apical y basolateral del epitelio intestinal se pueden aislar, separar y purificar por sus diferentes densidades, la membrana apical es un poco más densa que la basolateral debido a que tiene un citoesqueleto unido. Los fragmentos de la membrana plasmática rota que tienen los portadores de transporte, canales, o bombas tienden a cerrarse como vesículas redondas. Con estas vesículas se pueden realizar estudios de captación o eflujo de manera similar a los estudios con células completas. La concentración de iones dentro y fuera de la vesícula se puede controlar mejor que en las células completas, de manera que en tiempos más cortos puede ser estudiada y se puede obtener una mejor estimación de la estequiometría de una ruta de transporte dada (18).

Membranas del epitelio mucosal.

El uso de membranas aisladas totalmente del epitelio mucosal y la lámina propia evita la desventaja de las largas rutas de difusión a través de las capas de células musculares (27).

Anillos intestinales.

La preparación de anillos intestinales puede responder a la pregunta de la posible captación de sustancias por células mucosales. El procedimiento de la prueba no

difiere del método del saco evertido excepto por que las secciones intestinales se cortan en piezas de 0.5 a 1 centímetros de longitud y se agitan en una adecuada suspensión oxigenada. Debido a que los músculos de los especímenes intestinales inmediatamente se contraen, las vellosidades del intestino delgado llegan a quedarse sobre la superficie y están bien distendidas (27).

Suspensiones de células mucosales.

La única ventaja que tienen sobre los anillos intestinales es que su uso evita la captación de sustancias dentro de los tejidos que no participan en la absorción tales como músculo, células de tejido conectivo, etc. Sin embargo, la técnica de la preparación es relativamente complicada. Con el fin de verificar si las células son dañadas o no durante la preparación se pueden usar colorantes tal como azul de timol ; las células vivas no captan el color (27, 29).

Fracciones subcelulares.

Las vesículas de la membrana del borde en cepillo se pueden obtener a partir de las células mucosales aisladas por centrifugación diferencial y de gradiente con centrifugas de alta velocidad. Sin embargo, se debe puntualizar en que las vesículas de la membrana del borde en cepillo obtenidas de esta manera contienen una gran fracción de membranas terminales las cuales se deben asignar al interior celular y no a la membrana celular. Estas vesículas han sido investigadas principalmente por su contenido de enzimas y su habilidad para formar uniones selectivas con ciertas sustancias (27).

Cultivos celulares.

Las células epiteliales cultivadas, especialmente líneas continuas excluyen factores introducidos por las células endócrinas, células nerviosas, o nervios finales, y células inmunes que están presentes en el tejido aislado. Una línea cultivada que solo contiene un tipo celular sirve como un mejor modelo para el estudio de los mecanismos de transporte.

Recientemente se ha mostrado que algunas líneas celulares y en especial líneas celulares de carcinoma de colon humano son capaces de exhibir de manera permanente y espontánea o bajo condiciones de cultivo particular características de diferenciación de enterocitos maduros o células secretoras de moco y propiedades funcionales que son específicas del epitelio transportador.

Caco-2:

La línea celular Caco-2 fue establecida en cultivo en 1974 a partir de un adenocarcinoma de colon humano por Jorgen Fogh (18). Fue hasta 1983 (18) cuando se observó que las células sufren espontáneamente una típica diferenciación enterocítica bajo condiciones de cultivo estándar. La diferenciación enterocítica de las células Caco-2 presenta varias características cronológicas, morfológicas y funcionales precisas.

1. Las células no están diferenciadas cuando el crecimiento es exponencial, el inicio de la diferenciación ocurre en la confluencia (cuando las células detienen su división) y es total dentro de los 20 días. Esta situación se parece a la encontrada en el intestino delgado en donde las células de las criptas intestinales que proliferan no están diferenciadas y la diferenciación ocurre durante la migración desde las criptas a las vellosidades de células que no se están dividiendo.
2. En las últimas etapas del cultivo las células forman una monocapa polarizada que exhibe uniones estrechas bien definidas y presenta valores de resistencia eléctrica de aproximadamente $300\Omega\cdot\text{cm}^2$. La línea celular permite estudiar la importancia relativa de las rutas transcelular y paracelular en el transporte de un determinado fármaco. También se observan microvellosidades apicales que están organizadas en un borde en cepillo típico y que cubren la superficie celular. Estas microvellosidades en borde en cepillo son muy similares a las observadas en el intestino delgado normal y colon.
3. Hidrolasas que normalmente están presentes en la microvellosidad en borde en cepillo del intestino delgado pero están ausentes en el colon, están asociadas con la membrana microvellosa de las células Caco-2; estas hidrolasas incluyen a la sucrasa-isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa N, dipeptidilpeptidasa IV y la fosfatasa alcalina. Sin embargo, no todas las hidrolasas del borde en cepillo que se han identificado en el intestino delgado humano están presentes en las células Caco-2, tal es el caso de la hidrolasa maltasa-glucoamilasa, que está ausente. Durante la fase de crecimiento exponencial, la actividad enzimática es mínima; sin embargo, se inicia un incremento lineal en la confluencia y después de 20 días se alcanzan valores que son para algunas enzimas tal como la sucrasa y dipeptidilpeptidasa IV cercanos a los observados en el intestino delgado. No obstante, la expresión de las diferentes hidrolasas es heterogénea. La diferenciación enzimática de las células Caco-2 aumenta con el número de pases hasta valores máximos que permanecen estables después de 90 pases.
4. Después de la confluencia los cultivos de células Caco-2 que crecen sobre soportes impermeables forman domos que son un indicio de las propiedades de transporte transepitelial. No obstante, su ausencia no es suficiente para descartar la función de transporte.

Las propiedades morfológicas y bioquímicas de las células Caco-2 son más similares a las de las células epiteliales del intestino delgado que a las células colónicas. Sin embargo, la permeabilidad paracelular de los fármacos en el modelo Caco-2 es similar a la del epitelio colónico. Así varios fármacos que se absorben en el intestino delgado pero no en el colon tienen coeficientes de permeabilidad muy bajos en el modelo Caco-2. Tal es el caso de los compuestos hidrofílicos cuyo transporte está reducido a niveles muy bajos. No obstante, la permeabilidad de las monocapas Caco-2 se puede modular por el uso de un interruptor de calcio de manera que la resistencia transmembrana puede ser reversiblemente disminuída desde aproximadamente $280\Omega\cdot\text{cm}^2$ a aproximadamente $60\Omega\cdot\text{cm}^2$.

Caco-2 posee atributos que la hacen un modelo apropiado de sistema *in vitro* para la investigación del transporte pasivo de los fármacos a través del epitelio del intestino delgado.

- Son monocapas bien caracterizadas y homogéneas.
- Nos permiten excluir la influencia de varios factores tales como moco y otras poblaciones celulares.
- Con excepción de la mucina, el modelo Caco-2 parece tener las tres principales barreras de permeabilidad para la absorción de los fármacos como son:
 1. La capa de agua estacionaria (no agitada)
 2. El complejo de unión, incluyendo a las uniones estrechas intercelulares.
 3. La monocapa celular.

Cuando la difusión de una molécula a través de las células Caco-2 es pasiva, el transporte no es saturable y la velocidad de transporte desde el lado luminal al lado basolateral de las monocapas es el mismo que en dirección opuesta. Es probable que las células Caco-2 también sean útiles para estudios de metabolismo ya que tienen muchas enzimas del borde en cepillo de la mucosa del intestino delgado en cantidades similares a las encontradas *in vivo*.

El modelo Caco-2 puede ser una alternativa útil a los modelos animales para el estudio de la absorción intestinal de los fármacos, además de ser una herramienta en la preformulación y optimización de sistemas de liberación oral de fármacos (18, 30, 31, 32, 33, 34, 9, 10, 35, 36, 8).

5. Empleo de Bencimidazoles en el tratamiento de infecciones parasitarias.

Las enfermedades parasitarias tanto las protozoosis como las helmintosis representan un problema de salud pública en muchas partes del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. Aún cuando la mayor parte de las helmintosis se circunscriben a la luz intestinal, algunas de ellas tienen diseminación sistemática y se alojan en diversos tejidos ejemplos de estas parasitosis son la fasciolosis, cisticercosis y triquinelosis (1,2).

Con respecto al tratamiento de las helmintosis, los bencimidazoles y en especial los bencimidazol carbamatos son los fármacos más ampliamente usados. En la tabla 1 se presentan algunos de los compuestos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de las diversas infecciones por helmintos.

Tabla 1. Perfil terapéutico de fármacos empleados en el tratamiento de helmintosis humanas.

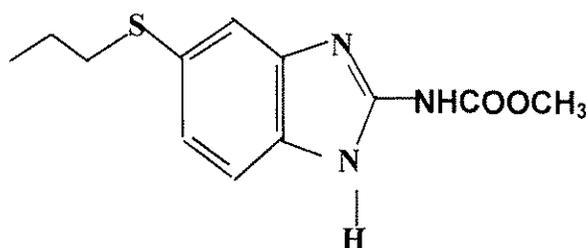
Fármaco (Inventor/compañía)	Dosis recomendada en adulto (oral)	Helmintiasis
Amoscanato (Ciba-Geigy)	7 mg/kg por 3 días	Schistosomiasis
Bithionol (I.G. Farbenind, Monsanto)	30-50 mg/kg distribuido en 10 a 15 dosis o en días alternados	Paragonimiasis e infección por <i>Fasciola hepática</i>
Diclorofeno (Burton T. Bush)	2 a 3 g cada 8 horas por 3 dosis	Infecciones por <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia saginata</i>
Dietilcarbamazina (American Cyanamid)	4-6 mg/kg (citrato) ó 2-3 mg (base) dado en 3 dosis durante 14-21 días	Filiariasis linfática y loasis
Ivermectina (MSD)	Dosis única de 100-200 mg/kg	Filiariasis linfática
Levamisol (Janssen, ICI)	Dosis única de 2.5 mg/kg	Ascariasis
Metronidazol (Rhone-Poulenc)	250 mg 3 veces al día por 3 días	Infección por el parásito de Guinea
Metrifonato (Bayer)	7.5 mg/kg por 5 días	Cisticercosis
Niridazol (Ciba)	25 mg/kg por 7 días	Schistosomiasis
Praziquantel (E. Merck, Bayer)	10-25 mg/kg por 1-2 días 25 mg/kg por 3-6 días Dosis única de 40 mg/kg	Cisticercosis Schistosomiasis
Tetracloroetileno (Columbia-Southern)	0.1 ml/kg (max. 5 ml) en ayuno	Infecciones por <i>Ancylostoma</i> y <i>Heterophyes sp.</i>
Niclosamida (Bayer)	2 g (divididos en 4 tabletas masticables)	Todas las infecciones por gusanos planos
Oxamniquina (Pfizer)	15 mg/kg dos veces al día por 3 días	<i>Schistosomia mansoni</i>

Fármaco (Inventor/compañía)	Dosis recomendada en adulto (oral)	Helmintiasis
Pamoato de pirantel (Pfizer)	Dosis única de 10 mg/kg (max. 1g) 10-20 mg/kg	Ascariasis, enterobiasis Infecciones por <i>Ancylostoma</i>
Pamoato de Oxantel (Pfizer)	Dosis única de 10-20 mg/kg (base)	Trichuriasis
Piperazina (Dow, BDH, etc.)	75 mg/kg (max. 3.5-4 g) por 2 días	Ascariasis, enterobiasis
Cambendazol (MSD)	5 mg/kg	Strongyloidiasis
Mebendazol (Janssen)	100 mg dos veces al día por 3 días 200 mg dos veces por 20 días 400-600 mg 3 veces al día por 21-30 días	Ascariasis, enterobiasis, trichuriasis, strongyloidiasis Capiliariasis Quiste hidatídico
Flubendazol (Janssen)	200 mg diariamente por 3 días o 100 mg dos veces por día durante 3 días	Infecciones por <i>Ancylostoma</i> y trichuriasis
Albendazol (SKF)	Dosis única de 400 a 800 mg	Ascariasis, enterobiasis, trichuriasis, strongyloidiasis e infecciones por <i>Ancylostoma</i>
Tiabendazol (MSD)	25 mg/kg (max. 3g en dosis diaria)	Enterobiasis, trichinosis, strongyloidiasis, capilariasis, larva migrans cutánea y toxocariasis

Tomado de Sharma S. (37).

6. Características Fisicoquímicas y estudios de Absorción Gastrointestinal del Albendazol.

El **albendazol** es un bencimidazol carbamato ampliamente usado en la actualidad. Su espectro de acción incluye la mayor parte de las infecciones por helmintos intestinales y además es efectivo contra infecciones sistémicas como la trichinellosis y neurocisticercosis. Se ha sugerido que la acción antihelmíntica del **albendazol** se debe a su metabolito principal, el sulfóxido de albendazol, el cual tiene mejor penetración tisular que el mismo **albendazol**. A pesar de su uso generalizado su eficacia a nivel sistémico se ve limitada por su pobre absorción intestinal debida principalmente a su baja solubilidad en agua. En consecuencia, las concentraciones plasmáticas son mínimas y la biodisponibilidad en tejidos es pobre. La absorción intestinal es solo un 5% de la dosis ingerida y su tolerancia ha permitido el empleo de este fármaco en tratamientos prolongados (38, 39, 3, 40, 41, 42, 43).



Albendazol

Solubilidad del Albendazol.

Algunas propiedades fisicoquímicas del **albendazol** y su metabolito principal el sulfóxido de albendazol fueron determinadas recientemente (44). Para los estudios de solubilidad se emplearon disolventes tales como metanol, etanol, dimetil sulfóxido, cloroformo, acetona, tween 80, ácido acético y ácido clorhídrico a diferentes concentraciones (0.1M, 1M y 0.3%). Los resultados revelaron la baja solubilidad del **albendazol** en muchos de los solventes utilizados, no obstante, en dimetilsulfóxido, cloroformo y ácido acético, la solubilidad fue mayor. Con respecto al sulfóxido de albendazol la solubilidad fue menor que para el compuesto principal, excepto en HCl (44).

La baja solubilidad acuosa del **albendazol** así como de otros bencimidazol carbamatos limita su eficacia contra estados sistémicos de infecciones parasitarias, razón por la cual se ha intentado mejorar su solubilidad, formulándolos en agentes solubilizantes tales como dispersiones sólidas, lo que ha conducido a un significativo incremento en su efecto contra parasitosis tisulares.

pka del albendazol.

Debido a la baja solubilidad del **albendazol** y de su metabolito principal el sulfóxido de albendazol, los valores de pka han sido determinados

espectrofotométricamente en el intervalo de pH 6 a 12. Los valores de pka obtenidos fueron 10.47 ± 0.17 y 9.79 ± 0.16 para albendazol y su sulfóxido respectivamente. Estos valores se atribuyen a la pérdida del protón del grupo amino en la posición 1. Además, se reportó un segundo valor de pka para un pH de aproximadamente 3 en el que ambos compuestos son más solubles, los valores obtenidos fueron aproximadamente 2.8 para el **albendazol** y 0.3 para el sulfóxido de albendazol. Estos valores se atribuyen a la protonación del nitrógeno en la posición 3 del anillo imidazol. A partir de estos resultados se concluyó que ambos compuestos son moléculas anfipróticas (44).

Estudios de Absorción del Albendazol.

Se han realizado varios estudios farmacocinéticos para el **albendazol** en animales y en el hombre sano, así como en pacientes que padecen neurocisticercosis y que se encuentran bajo tratamiento con **albendazol**. Sin embargo, los datos farmacocinéticos han sido difíciles de interpretar ya que han mostrado grandes variaciones intra e inter individuales en los niveles plasmáticos después de la administración oral, lo cual se atribuye entre otras cosas a la lenta y errática disolución del fármaco y problemas en la absorción *in vivo* (45, 46, 47, 4, 48).

En 1991, Prieto y colaboradores (4), realizaron un estudio comparativo sobre la absorción gástrica del **albendazol** y **mebendazol** en ratas mediante la técnica de perfusión recirculante empleando un amplio intervalo de concentraciones (0.5, 1, 5, 10, 20, 50, y 100mM). Los resultados revelaron que la absorción del **albendazol** y **mebendazol** a partir del lumen gástrico sigue una cinética de primer orden con una constante de difusión de 0.0087min^{-1} para el **albendazol** y 0.0077min^{-1} para el **mebendazol** y que los procesos de absorción se deben a mecanismos cinéticos de difusión simple, y por lo tanto ningún mecanismo de cinética saturable está involucrado. En este estudio se consideró que la pobre absorción del **albendazol** y **mebendazol** se podía deber a su limitada solubilidad en los fluidos gástricos. No obstante, se detectaron niveles plasmáticos de **albendazol** (1-13 $\mu\text{g/ml}$) y **mebendazol** (0.4-4.8 $\mu\text{g/ml}$) después de la perfusión, los cuales se incrementaron cuando la concentración de la solución perfundida aumentó.

La presencia de estos fármacos en la sangre de las ratas puede reflejar un metabolismo hepático diferente en esta especie y en el hombre. En pacientes humanos el albendazol y **mebendazol** no se detectan en la sangre, solo sus metabolitos por lo que la rata no parece ser un buen modelo animal experimental para estudiar la farmacocinética de derivados bencimidazólicos *in vivo* (4).

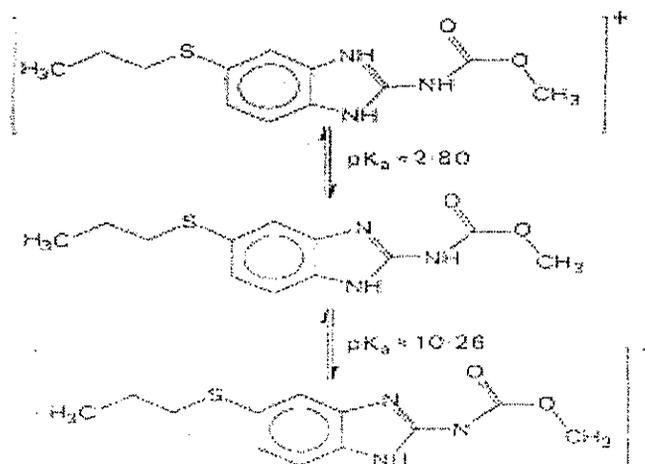
En un estudio posterior, Villaverde y colaboradores (5) evaluaron la captación del **albendazol** y **mebendazol** por la técnica de enterocitos aislados de rata en suspensión, empleando diferentes concentraciones (10, 25, 50, 75, 100, 225, y 500 μM) de los fármacos. Estos se disolvieron en dimetilsulfóxido a una concentración final del disolvente del 1%, lo que permitió tener a los fármacos completamente disueltos hasta concentraciones de 250 μM . Sin embargo, para concentraciones mayores surgieron problemas de solubilidad. Los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones empleadas mostraron que la captación del **albendazol** se incrementó significativamente hasta la concentración de 200 μM , mientras que la captación de **mebendazol** no

aumentó para concentraciones superiores a $100\mu\text{M}$. Además, el mayor contenido de antihelmíntico absorbido por arriba de esas concentraciones fue similar en ambos casos (alrededor de $20\mu\text{mol/mg}$ proteína). Así mismo, se observó que para concentraciones menores a $100\mu\text{M}$ el proceso que rige la captación de los fármacos en los enterocitos aislados es la difusión pasiva, mientras que para concentraciones superiores se apreció una aparente captación no lineal, lo cual se atribuyó a la precipitación de los compuestos debido a los problemas de solubilidad en el medio de incubación. Los resultados mostraron también una mejor captación para el **mebendazol** en todo el intervalo de concentraciones desde $0-100\mu\text{M}$, lo que se explicó por la liposolubilidad ligeramente mayor del **mebendazol** comparada con la del **albendazol** (5).

Recientemente, Jung y colaboradores (1998) (44) estudiaron la absorción intestinal y gástrica *in vitro* del **albendazol** por el método del saco intestinal invertido de rata empleando las diferentes regiones del intestino (duodeno, yeyuno, ileon y colon). A partir de los resultados obtenidos se observó que el **albendazol** se absorbe a lo largo del intestino; lo cual radica en el hecho de que el compuesto está casi no ionizado entre pH 6 y 9, lo que explica su absorción. La absorción decreció en el siguiente orden ileon>yeyuno>colon>duodeno. La cinética fue de orden cero, lo que se atribuyó a la existencia de una solución saturada debida a la precipitación del fármaco en todos los estudios que se realizaron.

Además, en este estudio la absorción en el estómago fue mayor que en el intestino y con una constante de velocidad de orden cero, mayor que la de la absorción intestinal. Esta mayor absorción se atribuyó a la mejor solubilidad del fármaco en medio ácido, por lo tanto, aún cuando la concentración del ión protonado es alta, es posible que cuando el **albendazol** está en contacto con la membrana celular pierda el protón y se absorba, lo que se explica en virtud de la alta solubilidad lipídica de la forma ionizada disuelta.

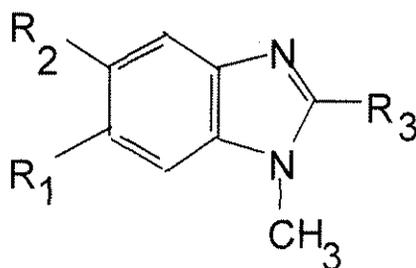
Los autores sugirieron, que la absorción tiene lugar por un proceso no saturable tal como la difusión pasiva y que la solubilidad y no la absorción es el paso limitante de la velocidad de absorción del fármaco (44).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Considerando que los bencimidazoles, (en particular el **albendazol**) son fármacos ampliamente empleados en el tratamiento de infecciones parasitarias tanto a nivel intestinal como sistémico, que tienen como limitante su baja solubilidad y biodisponibilidad, en la Facultad de Química se diseñaron y sintetizaron compuestos derivados del 1-metilbencimidazol con la finalidad de obtener moléculas con mejores características de solubilidad y actividad antiparasitaria (6) (Tabla 2).

Tabla 2. 1-Metilbencimidazoles diseñados con posible actividad biológica.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Serie A			
1	H	H	CH ₃
2	H	H	NH ₂
3	H	H	SH
4	H	H	SCH ₃
Serie B			
5	H	Cl	CH ₃
6	H	Cl	NH ₂
7	H	Cl	SH
8	H	Cl	SCH ₃
Serie C			
9	Cl	H	CH ₃
10	Cl	H	NH ₂
11	Cl	H	SH
12	Cl	H	SCH ₃
Serie D			
13	Cl	Cl	CH ₃
14	Cl	Cl	NH ₂
15	Cl	Cl	SH
16	Cl	Cl	SCH ₃

Como se puede apreciar todos estos compuestos conservan el núcleo del bencimidazol, sustituido en la posición 1 por un grupo metilo (CH₃). La posición 2 se sustituye con diferentes grupos y las posiciones 5 y 6 pueden estar o no sustituidas con un grupo cloro.

Así tenemos que para los compuestos 1 a 4 de la serie A la posición 2 se sustituye con grupos isostéricos como son el -NH₂, -CH₃, -SH y -SCH₃, en cambio las posiciones 5 y 6 no están sustituidas.

En los compuestos **5** a **8** de la serie **B** la posición 2 también se sustituye con grupos isostéricos como son el $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SH}$ y $-\text{SCH}_3$, la posición 5 es sustituida por un cloro mientras que la posición 6 no está sustituida.

En los compuestos **9** a **12** de la serie **C** la posición 2 también se sustituye con los mismos grupos isostéricos pero en ellos la posición sustituida por un cloro es la 6, mientras que la posición 5 no está sustituida.

Finalmente, los compuestos **13** a **16** de la serie **D** además de estar sustituidos en la posición 2 por los mismos grupos isostéricos mencionados anteriormente y presentan un grupo cloro en las posiciones 5 y 6, es decir están diclorados.

7. Estudios de actividad antiparasitaria de los 1-metilbencimidazoles en diferentes modelos parasitarios.

Los estudios de actividad biológica fueron realizados en el laboratorio de Parasitología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Para la evaluación de la actividad biológica de los 1-metilbencimidazoles se eligieron dos parásitos: *T. spiralis* como modelo de helminto, ya que en este se pueden evaluar tanto la fase intestinal como la parenteral y a *Giardia lamblia* como modelo de protozoario intestinal.

Efecto de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre *Giardia lamblia* (6).

La evaluación de la actividad biológica consistió en determinar la susceptibilidad *in vitro* de *G. lamblia* para estos compuestos mediante un método de subcultivos, para ello se siguió la metodología descrita por Cedillo y cols. (49).

En la evaluación de la actividad biológica se utilizaron 13 de los 16 diferentes compuestos representativos de las 4 series descritas. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de estas pruebas.

Tabla 3. Susceptibilidad de trofozoítos de *Giardia lamblia* a derivados del 1-metilbencimidazol.

Serie	Compuesto	CI50	I.C 95%
	Albendazol	0.01	0.007 - 0.013
	Metronidazol	0.21	0.14 - 0.27
A			
	1	0.56	0.30-1.03
	2	0.15	0.08
	3	ND	ND
	4	ND	ND
B			
	5	0.18	0.11-0.28
	6	0.09	0.04-0.17
	7	4.13	1.16-4.54
	8	0.14	0.16-0.32
C			
	9	0.001	0.0008-0.0012
	10	0.002	0.0018-0.0022
	11	ND	ND
	12	0.1	0.03-0.29
D			
	13	0.15	0.06 - 0.32
	14	0.19	0.14 - 0.26
	15	0.09	0.05 - 0.17
	16	0.15	0.06-0.32

ND = No determinada

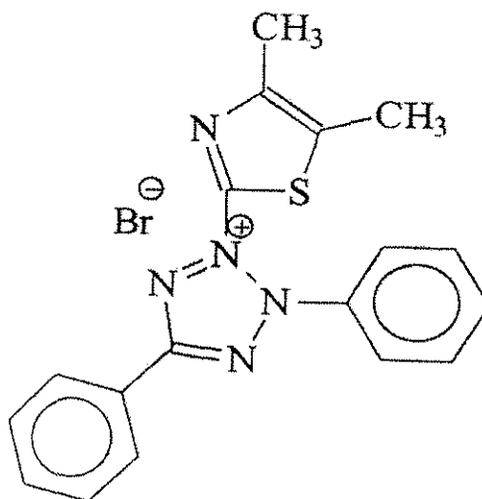
CI 50 = Concentración inhibitoria al 50%

I.C 95% = Intervalo de confianza al 95%

Como se puede observar la mayor parte de los compuestos son efectivos *in vitro* contra trofozoítos de *G. lamblia*, especialmente los compuestos con cloro en posición 6 que mostraron una actividad semejante a la del albendazol, aunque los compuestos diclorados en posición 5 y 6 mostraron buena actividad, la mayor parte de ellos mejor que la del metronidazol que es el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis. Por microscopía electrónica de barrido se observó el daño producido por los compuestos 9 y 13 a los trofozoítos de *G. lamblia*, principalmente a nivel de la membrana celular observándose un gran número de orificios que le dan aspecto poroso a la célula sin afectar el disco ventral.

Efecto de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre *Trichinella spiralis* (6).

La evaluación de la actividad biológica consistió en determinar la viabilidad de las larvas adultas y de las larvas musculares de *T. spiralis* cuando se incuban con diferentes concentraciones de los compuestos, empleando un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT).



MTT
ROJO CLARO

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de estas pruebas.

Tabla 4. Porcentaje de reducción de la viabilidad del adulto y larva muscular (LM) de *T. spiralis* utilizando los derivados del 1-metilbencimidazol.

Serie	Compuesto	Adulto 1µg/ml	LM 1µg/ml
	Albendazol	28 ± 7	22 ± 12
A			
	1	6	25 ± 6
	2	NR	9 8
B			
	5	8	14 ± 2
	6	NR	12 ± 1
	7	23 ± 12	7 ± 4
	8	34 ± 12	24 ± 10
C			
	9	25	14 ± 4
	10	NR	14 4
	12	14 ± 7	9 ± 5
D			
	13	23 ± 5	24 ± 6
	14	NR	26 ± 2
	15	15	30 ± 6
	16	29 ± 5	22 ± 11

NR = No Redujo

Los resultados obtenidos revelaron que el albendazol a una concentración de 1µg/ml (compuesto de referencia) disminuyó la viabilidad del parásito adulto un 28%, mientras que los compuestos 8 y 16 tuvieron una efectividad similar a la del **albendazol** (34% y 29% respectivamente).

Por otro lado, a una concentración de 1µg/ml los compuestos **1, 8, 13, 14, 15** y **16** fueron efectivos contra la larva muscular de *T. spiralis*, observándose un porcentaje de reducción de la viabilidad entre 22% y 30%, siendo el compuesto **15** el más activo.

Los estudios de microscopía electrónica mostraron que los compuestos causaron un mayor daño a la cutícula del organismo adulto que el observado con el **albendazol**.

Los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol (**13, 14, 15** y **16**) tuvieron una actividad *in vitro* contra la larva muscular de *T. spiralis* similar a la del **albendazol**, sin embargo, es necesario evaluar esta actividad *in vivo*. Para esto es de gran importancia en primera instancia determinar la permeabilidad de estos compuestos, la cual puede llevarse a cabo empleando el modelo *in vitro* de la línea celular Caco-2.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

VI. PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipos y Materiales.

A continuación se presentan los reactivos, materiales y equipos utilizados en las diferentes etapas del trabajo experimental.

Reactivos.

- Colágena de cola de rata (tipo I) BOEHRINGER MANNHEIM GmbH (Alemania)
- Medio de Dulbecco's modified Eagle (1x) GIBCO BRL (U.S.A)
- Solución de Hank's 10x (Solución Balanceada de Sales) GIBCO BRL (U.S.A)
- Amortiguador de Sales de Fosfato Dulbecco's (1x) GIBCO BRL (U.S.A)
- Solución de Piruvato de Sodio 100mM (100x) GIBCO BRL (U.S.A)
- Suero fetal bovino Hy Clone, Co. (U.S.A)
- Aminoácidos no esenciales (100x) In vitro , S.A. (México)
- Mezcla de Penicilina-Estreptomicina 10,000 U/ μ g/ml In vitro , S.A. (México)
- Dimetil sulfóxido J.T. Baker, (E. U.)
- Metanol HPLC J.T. Baker, (E. U.)
- Acido L-glutámico 5-amida (200mM) Merck Co. (México)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) Merck Co. (México)
- Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]-piper-azine-N'-[2-ethanesulfonic-acid]) Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo)
- D-glucosa. Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo)

Materiales.

- Cajas de 6 pozos para cultivo celular, diámetro del pozo 34.8 mm (area de crecimiento, 9.5 cm^2) Costar, Co (U.S.A)
- Frascos T-175 (area de crecimiento, 75 cm^2) Costar, Co (U.S.A)

- Snapwell, diámetro de 12 mm, (area superficial, 1.13 cm²) con una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.4µm. Costar, Co (U.S.A)
- Tubos Falcon de 15 mL Costar, Co (U.S.A)

Equipo.

- Balanza Analítica Scientech modelo SA210 (U.S.A).
- Cámara de Flujo Laminar Holten modelo HBB2448.
- Centrífuga Clínica Survall modelo RT6000D (DUPONT, U.S.A).
- Fluorómetro Fluostar modelo 403-0098.
- Incubadora NuAire IR AUTO FLOW.
- Jeringa Serológica de 50µl (Hamilton Co.).
- Microscopio Invertido Zeiss (Alemania Occidental).
- Potenciómetro Prazisions modelo E510 (Científica Internacional. S.A.).
- Vortex-Genie 2 modelo G-560.

2. Soluciones

- Solución 10mM en DMSO (Stock) para cada uno de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol y del **albendazol**.

Se pesó la cantidad necesaria de cada compuesto para preparar 5mL de una solución 10mM: **albendazol** (2650000ng/mL), **compuesto 13** (2150821.60ng/mL), **compuesto 14** (2160698.90ng/mL), **compuesto 15** (2331192.20ng/mL) se colocó en un matraz volumétrico de 5mL y se llevó al aforo con dimetil sulfóxido (DMSO)

- Solución Patrón A en DMSO (100000ng/mL) para cada uno de los compuestos y del **albendazol**.

Se preparó por triplicado una solución (A1, A2, A3) con una concentración de, 100000ng/mL para ello se tomó una alícuota correspondiente a 100000ng del compuesto a partir de la solución stock, se colocó en un tubo eppendorf y se llevó a 1mL con DMSO.

- Solución Patrón B en DMSO (1000ng/mL) para cada uno de los compuestos y del **albendazol**.

Se preparó por triplicado una solución (B1, B2, B3) con una concentración de 1000ng/mL, para ello se tomó una alícuota de 10 μ L (1000ng) a partir de la solución patrón A correspondiente (A1, A2, A3), se colocó en un tubo eppendorf y se llevó a 1mL con DMSO.

- Solución 10mM en DMSO de sulfóxido de albendazol (stock).

Se pesaron 14.0668 mg de sulfóxido de albendazol para preparar 5mL de una solución 10mM (2813360ng/mL), se colocó en un matraz volumétrico de 5mL y se llevó al aforo con DMSO. A partir de esta solución se preparó una dilución con una concentración de 100000ng/mL en DMSO.

- Solución salina de Hanks' (100mL)

Se pesaron 0.035g de bicarbonato de sodio, 0.1802g de glucosa y 0.2603g de hepes, se colocaron en un matraz volumétrico de 100mL, y se adicionaron 40mL de agua desionizada y filtrada con una membrana de 0.22. Una vez disueltos los reactivos se adicionaron 10mL de una solución 10x de Hanks', y se procedió a homogenizar la mezcla; el pH de la solución se ajustó a 7.3 y se diluyó hasta el aforo con agua desionizada y filtrada.

Para determinar el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol (**13,14,15**) y del **albendazol**, el trabajo experimental se llevó a cabo en varias etapas.

3. Validación del Método Analítico.

Para determinar la concentración de los compuestos diclorados **13**, **14**, y **15** y del **albendazol** en las muestras obtenidas a partir de los estudios de transporte se utilizaron los métodos analíticos desarrollados en el laboratorio de Parasitología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS para la técnica Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y se validaron de acuerdo a los procedimientos y criterios de aceptación establecidos en el Manual de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Q.F.B de México (50), Guía USP XXIII (51). Los parámetros que se validaron fueron: Linearidad, Precisión (repetibilidad y reproducibilidad), Exactitud (%de recobro), Selectividad, Límite de cuantificación y Límite de detección.

Condiciones Cromatográficas:

- Columna Spherisorb ODS-2, C18 fase reversa, tamaño de partícula de 5µm y una longitud de 240mm por 4.6mm de diámetro.
- Fase Móvil: Metanol/Buffer de fosfatos (68:32) pH 5.2
- Longitud de onda: 295nm
- Velocidad de flujo: 1.5 mL/min

Equipo HPLC.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-235 Perkin Elmer)
- Bomba HPLC 330 Perkin Elmer
- Detector de longitud de onda variable con arreglo de diodos Perkin Elmer

Preparación de la Curva Estándar.

Para cada compuesto se preparó por triplicado una curva estándar a partir de las diferentes soluciones patrón A y B a las siguientes concentraciones: 30,150,300,1500,3000 y 15000 (ng/mL) para el compuesto **13**; 150,300,1500,3000 y 15000 (ng/mL) para los compuestos **14**, **15** y el **albendazol** y se diluyeron hasta el aforo con solución salina de Hanks' como se indica a continuación:

Muestra	Alícuota(µL) a partir de la sol. patrón A ó B	Aforo(mL) con sol. salina de Hanks'	Concentración (ng/mL)
1*	30	1	30
2*	150	1	150
3 ⁺	3	1	300
4 ⁺	15	1	1500
5 ⁺	30	1	3000
6 ⁺	150	1	15000

⁺Alícuota a partir de la solución patrón A

*Alícuota a partir de la solución patrón B

Una vez homogenizadas las muestras, se tomó una alícuota de 500 μ L a partir de cada concentración estándar, se colocó en un tubo eppendorf y se adicionaron 20 μ L de una solución patrón de sulfóxido de albendazol (100000ng/mL) como estándar interno; posteriormente las muestras se agitaron durante 1 min

Se inyectaron las muestras correspondientes a cada compuesto (alícuotas de 50 μ L) en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución y posteriormente se determinó el área del pico del compuesto y el área del pico del estándar interno (sulfóxido de albendazol) en cada una de las muestras inyectadas.

Parámetros de Validación.

Linearidad del método.

Para determinar la linearidad del método analítico se prepararon 3 curvas estándar en solución de Hanks' en el rango de concentraciones de 30-15000 ng/mL para el compuesto **13** y de 150-15000 ng/mL para los compuestos **14**, **15** y **albendazol**. Se determinó la relación de áreas (área del compuesto/área del estándar interno = y) para cada concentración (x) y se calculó por regresión lineal el coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$), el intercepto (b) y la pendiente (m) de la recta para cada una de las curvas estándar.

Precisión intradía (repetibilidad).

Para determinar este parámetro se inyectó por sextuplicado la concentración estándar correspondiente al 100% (3000ng/mL de la curva 1) y se calculó el promedio (x), desviación estándar (n-1) y desviación estándar relativa en % (CV) para la relación de áreas (respuesta). El método se considera preciso cuando el CV es menor al 15%.

Precisión interdía (reproducibilidad).

Este parámetro se estableció entre 2 analistas y para dos días diferentes, de manera que cada analista preparó para cada día de análisis una nueva solución stock 10mM en DMSO para cada uno de los compuestos y a partir de esta solución stock preparó 3 curvas estándar. Para determinar la reproducibilidad del método analítico se compararon las respuestas de las curvas (pendientes de las rectas de las curvas) de 2 analistas en días diferentes con la prueba de ANADEVVA (Análisis de Varianza),

Nota: Cada analista preparó 6 curvas estándar debido a que fueron dos días de análisis.

El diseño experimental utilizado fue el siguiente:

DIA (j)	ANALISTA (j)	
	1	2
1	Y111	Y211
	Y112	Y212
	Y113	Y213
2	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

Criterio de aceptación:

$$F_{\text{tablas}} > F_{\text{calculada}}$$

Exactitud al 100%.

Se determinó la exactitud del método analítico para la concentración estándar correspondiente al 100% (3000ng/mL) para lo cual se calculó el valor de X (conc. ng/mL) para cada una de las respuestas (A.comp/A.std) obtenidas a partir del análisis por sextuplicado de la concentración al 100% utilizando la ecuación $y = mx + b$, y empleando el valor de la pendiente (m) y el intercepto(b) obtenidos a partir de la linealidad del método analítico. Así, la concentración de 3000ng/mL (adicionada) correspondía al 100% como la concentración promedio calculada (x)¿a qué porcentaje correspondía?

El CV en % para la concentración promedio calculada no debe ser mayor a un 15%.

Límite de cuantificación.

Este parámetro se determinó al analizar por triplicado diluciones sucesivas (150,30,20 y 10ng/mL) de la concentración más pequeña de la curva de calibración y establecer el mínimo nivel para el cual el analito puede ser cuantificado con exactitud y precisión aceptables.

El CV para la respuesta promedio no debe ser mayor al 20% y la desviación no debe exceder el 20% del valor nominal para la exactitud.

Límite de detección basado en la relación señal:ruido.

Este parámetro se determinó al analizar por duplicado muestras con concentraciones bajas de analito (10,20,30ng/mL) y establecer el mínimo nivel para el cual se obtuvo una respuesta de dos veces por encima del ruido del sistema.

Una relación señal:ruido de 3 o 2:1 generalmente es considerada aceptable para estimar el límite de detección.

Especificidad del método (selectividad).

Para determinar la selectividad del método analítico se obtuvieron y examinaron cromatogramas blanco de la matriz biológica (solución transportadora de Hanks')

inyectada a partir de varias fuentes y se compararon con una muestra de la solución transportadora de Hanks' añadida del compuesto bajo estudio y el estándar interno con el objetivo de demostrar la falta de respuesta en los blancos a través del intervalo de tiempo en el cual surge el pico del analito bajo estudio. La concentración que se utilizó para determinar este parámetro para cada uno de los compuestos bajo estudio fue 3000 ng/mL.

4. Determinación del coeficiente de distribución (Log D)

Se preparó una solución 10mM en dimetilsulfóxido (solución stock) para cada uno de los compuestos (**13,14,15** y **albendazol**)

Se colocaron 0.75mL de 1-octanol y 0.75mL de PBS pH 7.4 en un tubo eppendorf de 1.5mL.

Se adicionaron 15 μ L de la solución stock del compuesto y se agitó durante 30 min, posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 10000 rpm.

Finalmente se separaron las fases acuosa y orgánica y se cuantificaron por el método analítico descrito.

5. Cultivo y Mantenimiento de la Línea Celular Caco2.

El manejo de la línea celular Caco2, así como la preparación del medio de cultivo celular y de otros reactivos que estarían en contacto con ella antes de la realización de los estudios de transporte, se llevó a cabo en una campana de flujo laminar equipada con una lámpara de luz UV que permitió proporcionar un ambiente estéril en el interior de la campana.

La línea celular Caco2 cepa ASI4 pase número 56 fue donada por el Dr. Ismael Hidalgo de los laboratorios Absorption Systems (Exton, PA). Las células se cultivaron en frascos de plástico T-175 y se mantuvieron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) complementado a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se tripsinizaron por 3 min (sol. tripsina al 15% en EDTA) cuando tenían una confluencia no mayor del 80%, se colectaron en un tubo de plástico falcon de 15 mL y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. El sobrenadante fue desechado y las células fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco (DMEM complementado) para su conteo en una cámara de Neubauer.

Las células se resembraron en cajas de cultivo nuevas T-175 y se incubaron aproximadamente 4 días sin alcanzar una confluencia mayor al 80%. Tripsinizar con esta frecuencia permitió tener una relación 1:3; es decir, por cada caja T-175 tripsinizada se podían cultivar 3 nuevas cajas T-175.

Medio de Cultivo Celular Complementado (100mL).

Para preparar el medio de cultivo celular se adicionaron los siguientes reactivos al medio de Dulbecco's modified Eagle's (DMEM).

10% de suero fetal bovino

1% de aminoácidos no esenciales

1% de L-glutamina (200mM)

1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100g de streptomycin)

1% de piruvato de sodio

Todas las soluciones eran filtradas a través de una membrana de $0.22\mu\text{m}$ para su esterilización y la botella era sellada con cinta testigo para evitar su contaminación. El medio de cultivo se almacenó a 4°C .

6. Estudios de Transporte con la Línea Celular Caco2.

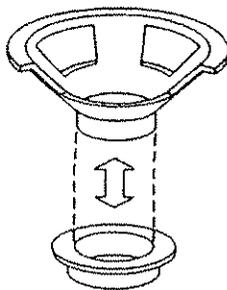
Recubrimiento de las membranas de policarbonato.

- Se preparó una solución de colágena como indica el proveedor. Para lo cual, se adicionó a un vial de 10mg del producto liofilizado (colágena) 5mL de ácido acético estéril al 0.2% para obtener una concentración de 3.64 mg/mL (3640000ng/mL). Para disolver completamente no se utilizó agitación, únicamente se procedió a incubar la solución durante 24h a temperatura ambiente.
- La solución se diluyó con etanol al 70% mezclando una parte de la solución anterior con tres partes de etanol.
- Se adicionaron $100\mu\text{L}$ de la solución de colágena a cada uno de los insertos snapwell asegurándose de cubrir toda la superficie del filtro.
- Se secaron los filtros en la campana de flujo laminar con las tapaderas abiertas durante una hora y media. Posteriormente las tapaderas fueron selladas con cinta testigo para mantener las condiciones de esterilidad hasta el día de su uso.
- Los insertos se esterizaron el día de su uso por radiación U.V. durante media hora en la campana de flujo laminar con las tapas abiertas.

Cultivo celular en Insertos Snapwell

Aproximadamente 6.8×10^4 células obtenidas de la tripsinización de los cultivos celulares en las cajas T-175 se resuspendieron en 0.5 mL de DMEM complementado y se depositaron en cada uno de los insertos snapwell adicionando 2 mL de medio complementado en cada uno de los pozos.

Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% durante 21 a 28 días, el medio de cultivo se cambió a las 24h, después cada tercer día durante los primeros 8 días de cultivo y posteriormente el medio se cambió diariamente hasta el momento de la realización del estudio de permeabilidad.



membrana de policarbonato sobre la cual se cultivan las células Caco-2

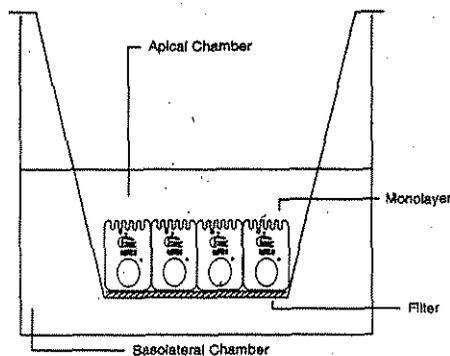
Estudios de permeabilidad

Se preparó una solución 100 μ M de cada uno de los compuestos en el amortiguador de transporte (solución de Hanks' + NaHCO₃, + 10 mM Hepes, + 10 mM de D. glucosa) a partir de la solución 10mM en DMSO. La solución se mantuvo a una temperatura de 37°C hasta el momento en que se inició el experimento.

Todos los estudios de transporte se realizaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y con agitación constante. Estas condiciones se mantuvieron durante la hora y media que duró el experimento y durante la determinación postexperimento de la integridad de la monocapa.

Antes de iniciar los estudios de transporte (Apical a Basolateral y Basolateral a Apical) el medio de cultivo contenido en los insertos (0.5mL) y en los pozos (2mL) fue retirado, los insertos se enjuagaron 1 vez con un exceso del amortiguador de transporte que también fue retirado con cuidado y posteriormente se adicionaron 0.5mL de la solución transportadora en la parte apical y 2mL en el pozo para equilibrar a las células durante 30 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Se realizaron 2 ensayos de permeabilidad, por triplicado cada uno de ellos: del lado Apical al lado Basolateral (A-B) y del lado Basolateral al lado Apical (B-A) para cada uno de los compuestos (**13,14,15** y **albendazol**).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I Estudios de transporte del lado Apical al lado Basolateral.

Una vez equilibradas las células en la solución transportadora, ésta fue retirada de ambos lados (apical y basal), y en su lugar se colocaron en los insertos 0.5 mL de la solución 100 μ M del compuesto y 2 mL del amortiguador de transporte (libre del compuesto) en cada uno de los pozos.

Se tomaron del lado basolateral muestras de 500 μ L a los 15,30,45,60 y 90 min después de iniciado el experimento, después de realizar la toma de cada una de las muestras, los insertos se colocaban en otro pozo con amortiguador de transporte libre de

fármaco. Así mismo, a los 90 min se tomaron los 0.5mL de la solución 100 μ M del compuesto contenidos en el inserto (solución donadora), se colocaron en un tubo eppendorf y se guardaron a 4°C (18h) hasta el momento de su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

II Estudios de transporte del lado Basolateral al lado Apical

Una vez equilibradas las células en la solución transportadora, esta fue retirada de ambos lados (apical y basal), y en su lugar se colocaron 2mL de la solución 100 μ M del compuesto en el pozo y 0.5mL del amortiguador de transporte (libre del compuesto) en el inserto.

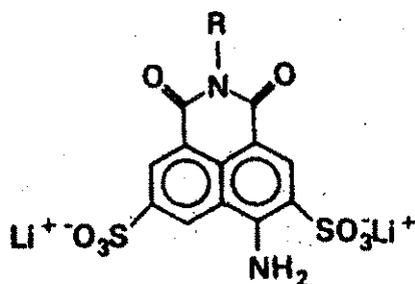
Se tomaron del lado apical muestras de 200 μ L a los 15,30,45,60 y 90 min después de iniciado el experimento, con reposición del amortiguador de transporte. Así mismo, a los 90 min se tomaron 0.5mL de la solución 100 μ M del compuesto contenidos en el pozo (solución donadora). Las muestras obtenidas se colocaron en tubos eppendorf y se guardaron a 4°C (18h) hasta el momento de su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Integridad de la Monocapa

Para determinar que los compuestos no tienen efecto sobre la monocapa celular y que los resultados no se debieron a que las monocapas estuvieran destruidas, al finalizar los estudios de transporte se midió el paso del amarillo de lucifer (colorante 4-aminonaftalimida substituido de intensa fluorescencia, fácilmente visible en células vivas a concentraciones y niveles de iluminación a los cuales no es tóxico. Debido a su bajo peso molecular (457.2) y solubilidad en agua el colorante no cruza la membrana celular, propiedad que ha sido utilizada para determinar los cambios en la permeabilidad de las uniones intercelulares ya que esta es la ruta que sigue para pasar de un lado de la célula al otro) a través de la línea celular, para lo cual se colocaron 0.5mL de una solución de amarillo de lucifer en los insertos y 2mL del amortiguador de transporte en los pozos de una caja nueva en la cual se colocaron los insertos del experimento A-B y B-A. Se incubó durante 1h con agitación continua a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Una vez concluido el tiempo de la incubación, se tomaron alícuotas de 200 μ L (por duplicado) a partir de cada pozo, las muestras se leyeron en un lector de fluorescencia a una longitud de emisión de 538 nm y a una longitud de excitación de 485 nm. Así mismo, se incluyó una curva estándar del amarillo de lucifer en el intervalo de concentración de 0.3125 μ M -100 μ M (142.89ng/mL-45725ng/mL) a partir de la cual se determinó la concentración del amarillo de lucifer en las muestras obtenidas a partir de los pozos.

Finalmente se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) para el amarillo de lucifer. Los insertos o monocapas con un valor superior a 1x10⁻⁸ cm/s se consideraron fuera del experimento.



Amarillo de lucifer

7. Determinación del Coeficiente de Permeabilidad Aparente de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol.

Para cada compuesto se preparó una curva estándar en solución de Hanks' (como se indicó en la validación del método analítico) a las siguientes concentraciones: 30,150,300,1500,3000 y 15000 ng/mL para el compuesto **13** y 150,300,1500,3000 y 15000 ng/mL para los compuestos **14**, **15** y el **albendazol**.

A cada una de las muestras apicales (200 μ L obtenidas en el experimento B-A) se les adicionó 8 μ L de una solución patrón (100000 ng/mL) del estándar interno sulfóxido de albendazol y se procedió a su homogenización por agitación durante 1min.

Así mismo, a cada una de las muestras basolaterales (500 μ L tomadas en el experimento A-B) se les adicionaron 20 μ L del estándar interno sulfóxido de albendazol (100000ng/mL) procediendo a su homogenización por agitación con la ayuda de un vortex durante 1min.

A partir de la solución donadora (Apical ó Basolateral) se tomó una alícuota de 500 μ L, se colocó en un tubo eppendorf y se adicionaron 20 μ L del estándar interno sulfóxido de albendazol (100000ng/mL), procediendo a su homogenización por agitación durante 1min

Todas las muestras, así como la curva estándar y una alícuota de la solución 100 μ M de cada compuesto fueron inyectadas en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución para determinar el área del pico del compuesto y el área del pico del estándar interno y así establecer la relación de áreas entre el compuesto y el estándar interno (A.comp./A.std int) como la respuesta medida (y).

Con los datos obtenidos a partir de la curva estándar se graficó la respuesta (y) contra la concentración (x) y se calculó mediante regresión por mínimos cuadrados el coeficiente de correlación (r), el intercepto (b) y la pendiente (m) de la recta.

Con la pendiente (m) e intercepto (b) obtenidos a partir de la curva estándar así como con la relación de áreas calculada para cada una de las muestras inyectadas y a

partir de la ecuación $Y = mx + b$ se pudo determinar el valor de "x" es decir, la concentración para cada una de las muestras (apicales y basolaterales).

Una vez determinada la concentración de las muestras (Apicales y Basolaterales), se procedió a calcular la concentración acumulada del compuesto a través del tiempo de muestreo para los estudios Apical-Basolateral, Basolateral-Apical de la siguiente manera:

Apical-Basolateral	Basolateral-Apical
$Cacu. + Cs.r$	$Cs.r + 0.4 * Cacu.$

Donde.

$Cacu.$ = Concentración acumulada del compuesto en el tiempo anterior.

$Cs.r$ = Concentración del compuesto en la solución receptora para el tiempo actual

Con los datos obtenidos se hizo una gráfica de la concentración acumulada (y) a través del tiempo (x), obteniéndose para la región más lineal de la curva el valor de la pendiente (que es igual a dC/dt) por el método de mínimos cuadrados.

El coeficiente de permeabilidad aparente ($Papp$) para cada uno de los compuestos se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$Papp = V \times dC/dt / A \times Co \times 60$$

Donde:

V = volumen de la solución receptora

dC/dt = cambio en la concentración de la solución receptora a través del tiempo

A = area superficial del filtro

Co = concentración inicial en la solución donadora

RESULTADOS

VII. RESULTADOS

1. Validación del Método Analítico.

Para cada compuesto analizado se siguieron los procedimientos y criterios de aceptación establecidos en el Manual de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Q.F.B de México para la validación del método analítico que se empleó en su posterior cuantificación en las muestras obtenidas a partir de los estudios de transporte. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la validación de los parámetros analíticos.

ALBENDAZOL

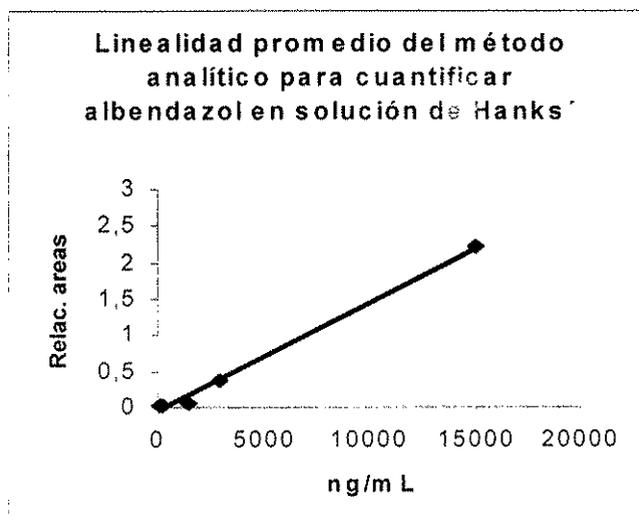
Linealidad del Método Analítico.

Relación de Areas (A comp/A std)

Con ng/ml	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MEDIA	D. Std	CV %
150	0,01430	0,01513	0,01830	0,01591	0,00211	13,28
300	0,03982	0,04295	0,04254	0,04177	0,00170	4,07
1500	0,05194	0,05181	0,05619	0,05331	0,00249	4,68
3000	0,38418	0,37281	0,39901	0,38533	0,01314	3,41
15000	2,14828	2,21633	2,28169	2,21543	0,06671	3,01

Datos de la determinación de la linealidad del método analítico.

Parámetro	Curva 1	Curva2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
m	0,00014	0,00015	0,00015	0,00015	4,52E-06	2,99
b	-0,05620	-0,06308	-0,06045	-0,05991	0,00347	5,799
r	0,99739	0,99725	0,99737	0,99734	7,43E-05	0,0074



Precisión Intra e Interdía.

Precisión intradía (Repetibilidad).

Concentración (ng/ml)	Réplica	Respuesta*
3000	1	0,384181
3000	2	0,343118
3000	3	0,351783
3000	4	0,342693
3000	5	0,342866
3000	6	0,313638
	Promedio de la Respuesta	0,346380
Parámetros	Desviación Estándar	0,022657
	CV %	6.54

*Relación de areas.

Precisión interdía (Reproducibilidad).

La reproducibilidad del método analítico se determinó comparando las pendientes de las curvas de 2 analistas en 2 días diferentes de análisis con la prueba: Análisis de Varianza.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza fueron los siguientes:

$$F_{\text{calculada analista}} = 1.16 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 18.51$$

$$F_{\text{calculada día}} = 1.03 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 4.46$$

De acuerdo con el criterio establecido concluimos que El método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días de análisis dado que $F_{\text{tablas}} > F_{\text{calculada}}$.

Exactitud al 100%.

Concentración adicionada (3000ng/ml)	Concentración obtenida (ng/ml)	% de recuperación
Réplica 1	2942,097	98,07
Réplica 2	2670,055	89,00
Réplica 3	2727,464	90,91
Réplica 4	2667,245	88,91
Réplica 5	2668,385	88,95
Réplica 6	2474,754	82,49
Promedio	2691,667	89,72
Desviación Estándar	150,102	5,003
CV %	5,58	5,58

Límite de Cuantificación.

Debido a la poca sensibilidad del método utilizado no fue posible cuantificar la respuesta del compuesto (Area) para las diluciones sucesivas (30, 20 y 10 ng/ml).

Por lo anterior, el límite de cuantificación para el **albendazol** quedó representado por la concentración más pequeña de la curva de calibración, la cual pudo ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables.

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima cuantificable, la cual fue de 150 ng/ml.

Límite de cuantificación para Albendazol

Concentración. adicionada	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
150	0,01430	0,01513	0,01830	0,01591	0,00211	13,28
Concentración obtenida	140.66	145.48	163.86	150	12.24	8.16
% de recobro	93.77	96.99	109.24	100	8.16	8.16

Límite de Detección.

El límite de detección basado en la relación señal:ruido = 2, fue de 30 ng/ml para el **albendazol**.

Especificidad del Método.

En la figura 6 se presentan los siguientes cromatogramas:

(A) Blanco de la solución de Hanks', (B) Solución de Hanks', adicionada con: 3000 ng/ml de **albendazol**.

Los tiempos de retención para el **sulfóxido de albendazol** y el **albendazol** fueron 2.6 y 7.5 minutos respectivamente.

A partir del cromatograma blanco de la solución de Hanks', podemos observar que por parte de la matriz biológica no surge pico alguno en los tiempos de retención del estándar interno y del **albendazol**, esto nos permite concluir que el método analítico es selectivo para el albendazol.

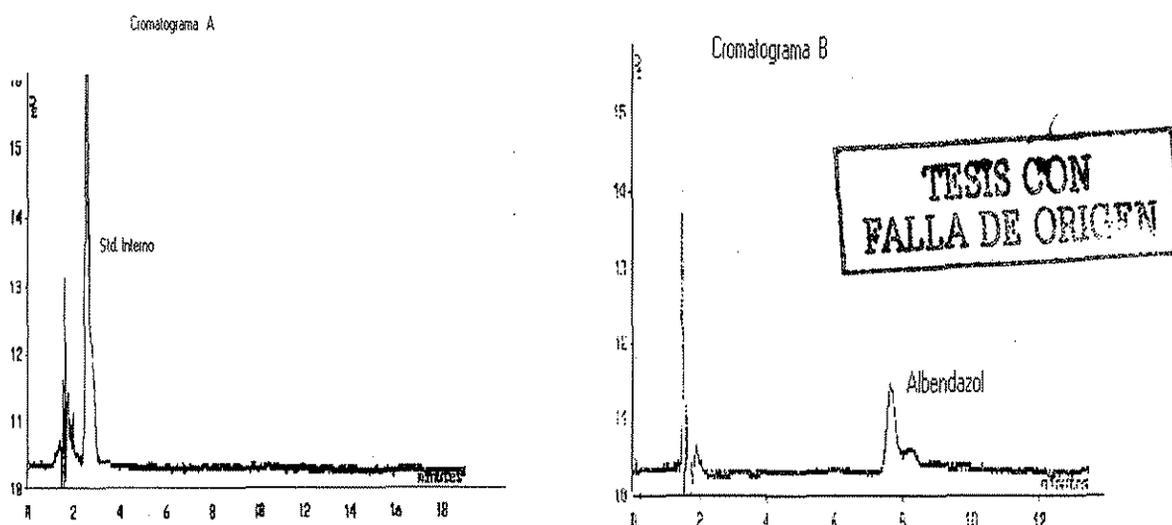


Figura 6.

Compuesto 13.

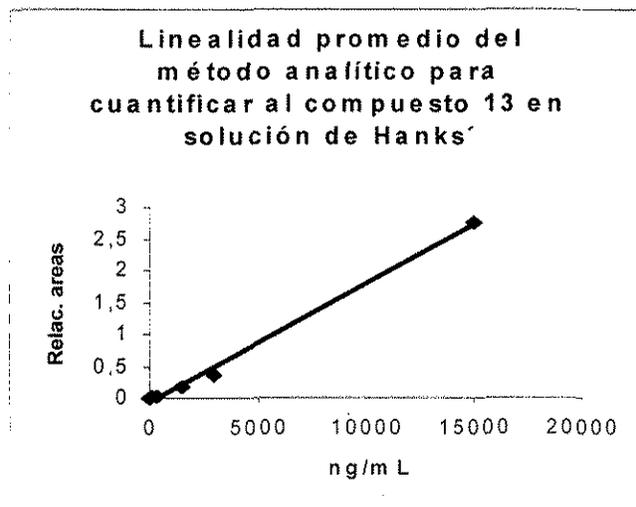
Linealidad del Método Analítico.

Relación de Areas (A comp/A std)

Con ng/ml	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MEDIA	D. Std	CV %
30	0,006653	0,006221	0,007081	0,006652	0,000430	6,46
150	0,017923	0,016999	0,019448	0,018123	0,001237	6,82
300	0,024007	0,027298	0,022974	0,024759	0,002258	9,12
1500	0,182200	0,158832	0,206671	0,182568	0,023922	13,10
3000	0,324674	0,395435	0,362713	0,360941	0,035413	9,81
15000	2,724130	2,800486	2,759348	2,761321	0,038216	1,38

Datos de la determinación de la linealidad del método analítico.

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
m	0,000183	0,000189	0,000186	0,000186	3,0E-06	1,61
b	-0,06513	-0,06193	-0,05557	-0,06088	0,004866	7,99
r	0,996823	0,998010	0,997755	0,997529	0,000625	0,0626



Precisión Intra e Interdía

Precisión intradía (Repetibilidad).

Concentración (ng/ml)	Réplica	Respuesta*
3000	1	0,35092
3000	2	0,40759
3000	3	0,41228
3000	4	0,37355
3000	5	0,36464
3000	6	0,39408
	Promedio de la Respuesta	0,38384
Parámetros	Desviación Estándar	0,02464
	CV %	6.42

*Relación de areas.

Precisión interdía (Reproducibilidad).

La reproducibilidad del método analítico se determinó comparando las pendientes de las curvas de 2 analistas en 2 días diferentes de análisis con la prueba: Análisis de Varianza.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza fueron los siguientes:

$$F_{\text{calculada analista}} = 1.24 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 18.51$$

$$F_{\text{calculada día}} = 0.93 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 4.46$$

De acuerdo con el criterio establecido concluimos que El método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días de análisis dado que $F_{\text{tablas}} > F_{\text{calculada}}$.

Exactitud al 100%.

Concentración adicionada (3000ng/ml)	Concentración obtenida (ng/ml)	% de recuperación
Réplica 1	2213,98	73,80
Réplica 2	2518,66	83,95
Réplica 3	2543,87	84,80
Réplica 4	2335,65	77,85
Réplica 5	2287,74	76,26
Réplica 6	2446,02	81,53
Promedio	2390,985	79,70
Desviación Estándar	132,482	4,416
CV %	5,54	5,54

Límite de Cuantificación.

Debido a la poca sensibilidad del método utilizado no fue posible cuantificar la respuesta del compuesto (Area) para las diluciones sucesivas (20 y 10 ng/ml).

Por lo anterior, el límite de cuantificación para el compuesto **13** quedó representado por la concentración más pequeña de la curva de calibración, la cual pudo ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables.

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima cuantificable, la cual fue de 30 ng/ml.

Límite de cuantificación para el Compuesto 13

Concentración. adicionada	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
30	0.00665	0.00622	0.00708	0.00665	0.000430	6.46
Concentración obtenida	29.88	25.38	34.34	29.87	4.48	15
% de recobro	99.60	84.60	114.47	99.56	14.93	15

Límite de Detección.

El límite de detección basado en la relación señal:ruido = 2, fue de 20 ng/ml para el compuesto **13**.

Especificidad del Método.

En la figura 7 se presentan los siguientes cromatogramas:

(A) Blanco de la solución de Hanks', (B) Solución de Hanks', adicionada con: 10,000 ng/ml del estándar interno **Sulfóxido de albendazol**; y 3000 ng/ml del compuesto **13**.

Los tiempos de retención para el **sulfóxido de albendazol** y el compuesto **13** fueron: 2.6 y 10.94 minutos respectivamente.

A partir del cromatograma blanco de la solución de Hanks', podemos observar que por parte de la matriz biológica no surge pico alguno en los tiempos de retención del estándar interno y del compuesto **13**, esto nos permite concluir que el método analítico es selectivo para el compuesto diclorado derivado del 1-metilbencimidazol.

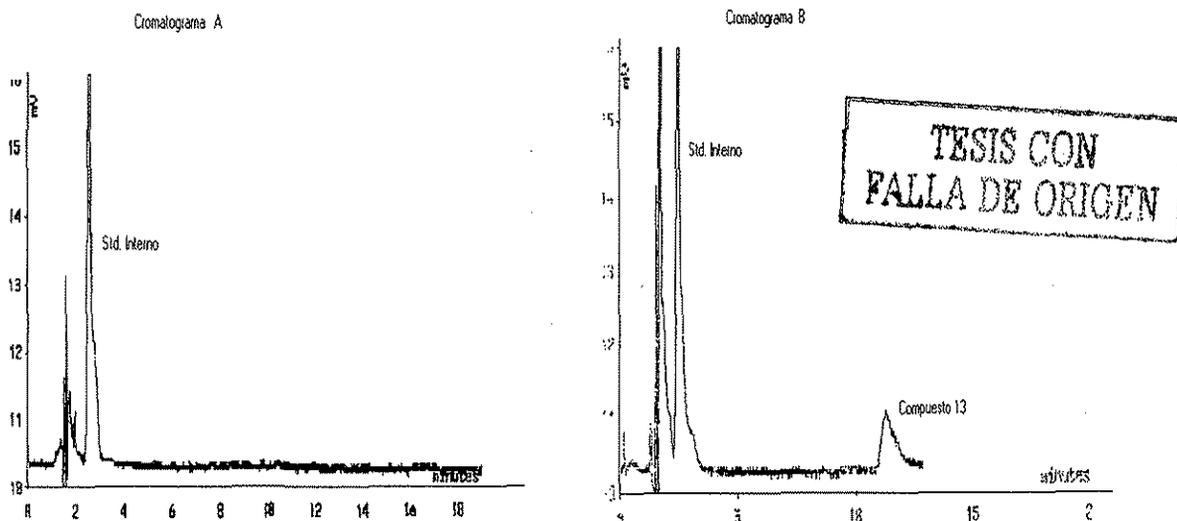


Figura 7.

Compuesto 14.

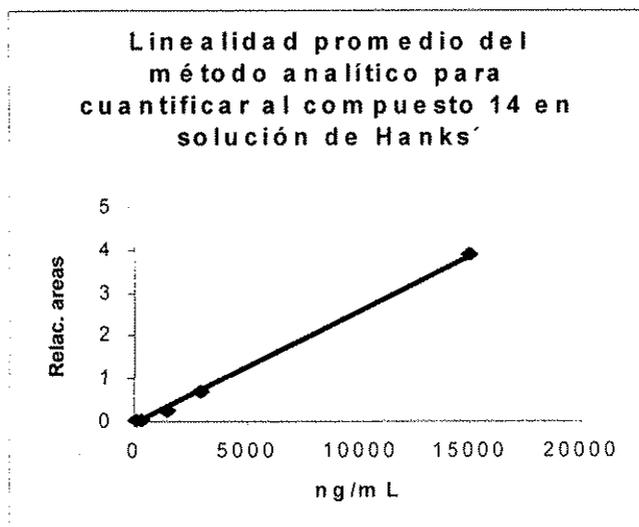
Linealidad del Método Analítico.

Relación de Areas (A comp/A std)

Con ng/ml	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	D. Std	CV %
150	0,031026	0,03337	0,02728	0,030559	0,003072	10,05
300	0,049578	0,051178	0,054916	0,051891	0,002739	5,279
1500	0,2707	0,271252	0,310005	0,283985	0,022535	7,935
3000	0,755674	0,692439	0,662934	0,703682	0,047381	6,733
15000	3,751746	4,071592	3,835089	3,886143	0,165922	4,269

Datos de la determinación de la linealidad del método analítico.

Parámetro	Curva 1	Curva2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
m	0,000253	0,000275	0,000258	0,000262	1.15E-05	4,402
b	-0,035732	-0,074321	-0,052498	-0,0541837	0.019349	35,71
r	0,999635	0,999388	0,99967	0,999564	0.000154	0.0154



Precisión Intra e Interdía

Precisión intradía (Repetibilidad).

Concentración (ng/ml)	Réplica	Respuesta*
3000	1	0,692439
3000	2	0,689521
3000	3	0,715438
3000	4	0,752456
3000	5	0,693656
3000	6	0,752418
	Promedio de la Respuesta	0,715988
Parámetros	Desviación Estándar	0,297023
	CV %	4.15

*Relación de áreas.

Precisión interdía (Reproducibilidad).

La reproducibilidad del método analítico se determinó comparando las pendientes de las curvas de 2 analistas en 2 días diferentes de análisis con la prueba: Análisis de Varianza.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza fueron los siguientes:

$$F_{\text{calculada}}_{\text{analista}} = 1.35 \quad F_{\text{tablas}} \text{ con } \alpha = 0.05 \text{ es } 18.51$$

$$F_{\text{calculada}}_{\text{día}} = 2.20 \quad F_{\text{tablas}} \text{ con } \alpha = 0.05 \text{ es } 4.46$$

De acuerdo con el criterio establecido concluimos que El método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días de análisis dado que $F_{\text{tablas}} > F_{\text{calculada}}$.

Exactitud al 100%.

Concentración adicionada (3000ng/ml)	Concentración obtenida (ng/ml)	% de recuperación
Réplica 1	2849,706	94,99
Réplica 2	2838,568	94,62
Réplica 3	2937,488	97,92
Réplica 4	3078,778	102,63
Réplica 5	2854,351	95,14
Réplica 6	3078,633	102,62
Promedio	2939.6	98
Desviación Estándar	113,3675	3,78023
CV %	3,85658	3,85658

Límite de Cuantificación.

Debido a la poca sensibilidad del método utilizado no fue posible cuantificar la respuesta del compuesto (Area) para las diluciones sucesivas (30, 20 y 10 ng/ml).

Por lo anterior, el límite de cuantificación para el compuesto **14** quedó representado por la concentración más pequeña de la curva de calibración, la cual pudo ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables.

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima cuantificable, la cual fue de 150 ng/ml.

Límite de cuantificación para el Compuesto 14

Concentración. adicionada	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
150	0.03103	0.03337	0.02728	0.03256	0.006189	10.05
Concentración obtenida	153.51	170.02	127.13	150.22	21.63	14.40
% de recobro	102.34	113.35	84.75	100.15	14.43	14.40

Límite de Detección.

El límite de detección basado en la relación señal:ruido = 2, fue de 30 ng/ml para el compuesto **14**.

Especificidad del Método.

En la figura 8 se presentan los siguientes cromatogramas:

(A) Blanco de la solución de Hanks', (B) Solución de Hanks', adicionada con: 10,000 ng/ml del estándar interno **Sulfóxido de albendazol**; y 3000 ng/ml del compuesto **14**.

Los tiempos de retención para el **sulfóxido de albendazol** y el compuesto **14** fueron 2.6 y 4.92 minutos respectivamente.

A partir del cromatograma blanco de la solución de Hanks', podemos observar que por parte de la matriz biológica no surge pico alguno en los tiempos de retención del estándar interno y del compuesto **14**, esto nos permite concluir que el método analítico es selectivo para el compuesto diclorado derivado del 1-metilbencimidazol.

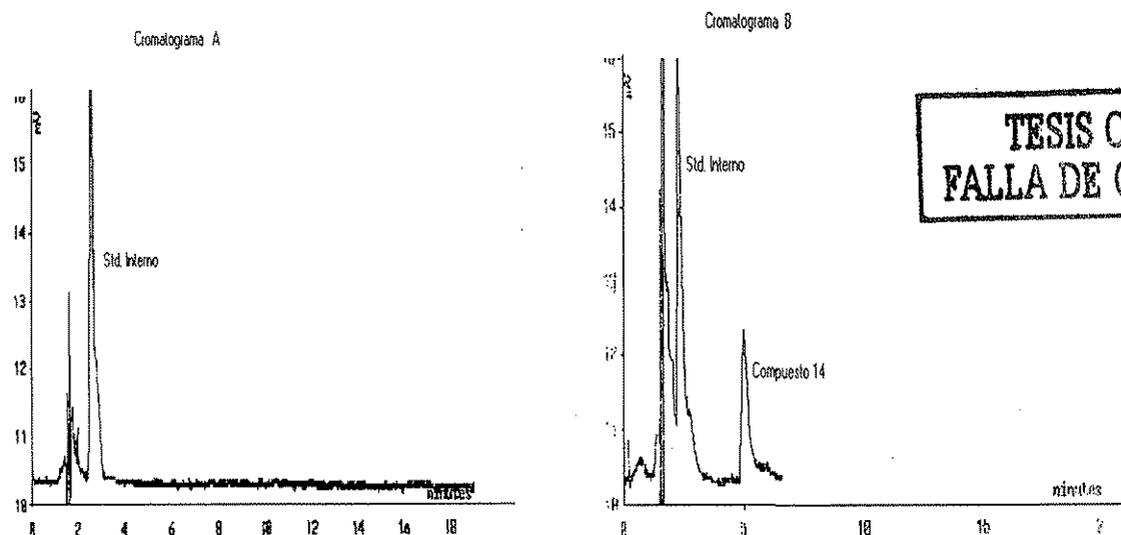


Figura 8.

Compuesto 15.

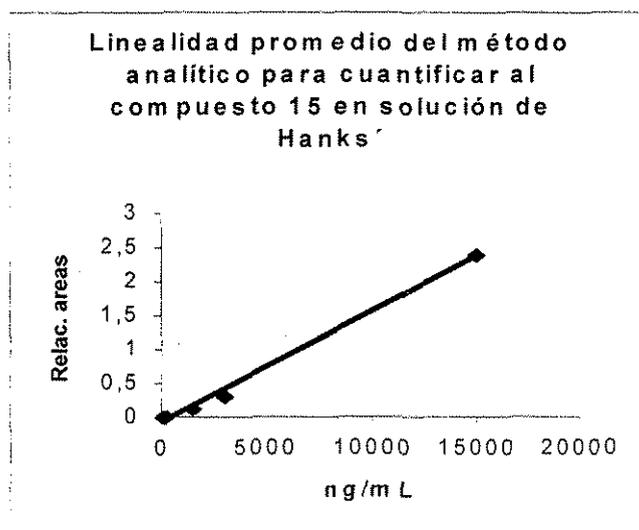
Linealidad del Método Analítico.

Relación de Areas (A comp/A std)

Con ng/ml	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	D. Std	CV %
150	0,008489	0,007154	0,006182	0,007275	0,001158	15,92
300	0,012747	0,013092	0,014741	0,013527	0,001066	7,878
1500	0,104941	0,113915	0,134114	0,117657	0,014942	12,69
3000	0,291185	0,284423	0,332361	0,302656	0,025946	8,573
15000	2,315183	2,447703	2,412931	2,391939	0,068709	2,872

Datos de la determinación de la linealidad del método analítico.

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
m	0,000159	0,000168	0,000165	0,000164	4,6E-06	2,794
b	-0,086267	-0,096355	-0,077254	-0,086625	0,009555	11,03
r	0,997468	0,996943	0,998352	0,997588	0,000712	0,0714



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Precisión Intra e Interdía

Precisión intradía (Repetibilidad).

Concentración (ng/ml)	Réplica	Respuesta*
3000	1	0,291185
3000	2	0,309943
3000	3	0,330768
3000	4	0,31323
3000	5	0,367607
3000	6	0,321927
	Promedio de la Respuesta	0,322443
Parámetros	Desviación Estándar	0,025797
	CV %	8

*Relación de áreas.

Precisión interdía (Reproducibilidad).

La reproducibilidad del método analítico se determinó comparando las pendientes de las curvas de 2 analistas en 2 días diferentes de análisis con la prueba: Análisis de Varianza.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza fueron los siguientes:

$$F_{\text{calculada analista}} = 0.066 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 18.51$$

$$F_{\text{calculada día}} = 2.89 \quad F_{\text{tablas con } \alpha = 0.05} \text{ es } 4.46$$

De acuerdo con el criterio establecido concluimos que El método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días de análisis dado que $F_{\text{tablas}} > F_{\text{calculada}}$.

Exactitud al 100%.

Concentración adicionada (3000ng/ml)	Concentración obtenida (ng/ml)	% de recuperación
Réplica 1	2303,719	76,79
Réplica 2	2418,097	80,60
Réplica 3	2545,079	84,84
Réplica 4	2438,140	81,27
Réplica 5	2769,707	92,32
Réplica 6	2491,171	83,04
Promedio	2494,319	83,1440
Desviación Estándar	157,3018	5,24339
CV %	6,30640	6,30640

Límite de Cuantificación.

Debido a la poca sensibilidad del método utilizado no fue posible cuantificar la respuesta del compuesto (Area) para las diluciones sucesivas (30, 20 y 10 ng/ml).

Por lo anterior, el límite de cuantificación para el compuesto **15** quedó representado por la concentración más pequeña de la curva de calibración, la cual pudo ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables.

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima cuantificable, la cual fue de 150 ng/ml.

Límite de cuantificación para el Compuesto 15

Concentración. adicionada	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación Estándar	CV %
150	0.00849	0.00715	0.00618	0.00727	0.001158	15.92
Concentración obtenida	179.13	147.09	123.78	150	27.79	18.52
% de recobro	119.42	98.06	82.52	100	18.53	18.52

Límite de Detección.

El límite de detección basado en la relación señal:ruido = 2, fue de 30 ng/ml para el compuesto **15**.

Especificidad del Método.

En la figura 9 se presentan los siguientes cromatogramas:

(A) Blanco de la solución de Hanks', (B) Solución de Hanks', adicionada con: 10,000 ng/ml del estándar interno **Sulfóxido de albendazol**; y 3000 ng/ml del compuesto **15**.

Los tiempos de retención para el **sulfóxido de albendazol** y el compuesto **15** fueron 2.6 y 4.70 minutos respectivamente.

A partir del cromatograma blanco de la solución de Hanks', podemos observar que por parte de la matriz biológica no surge pico alguno en los tiempos de retención del estándar interno y del compuesto **15**, esto nos permite concluir que el método analítico es selectivo para el compuesto diclorado derivado del 1-metilbencimidazol.

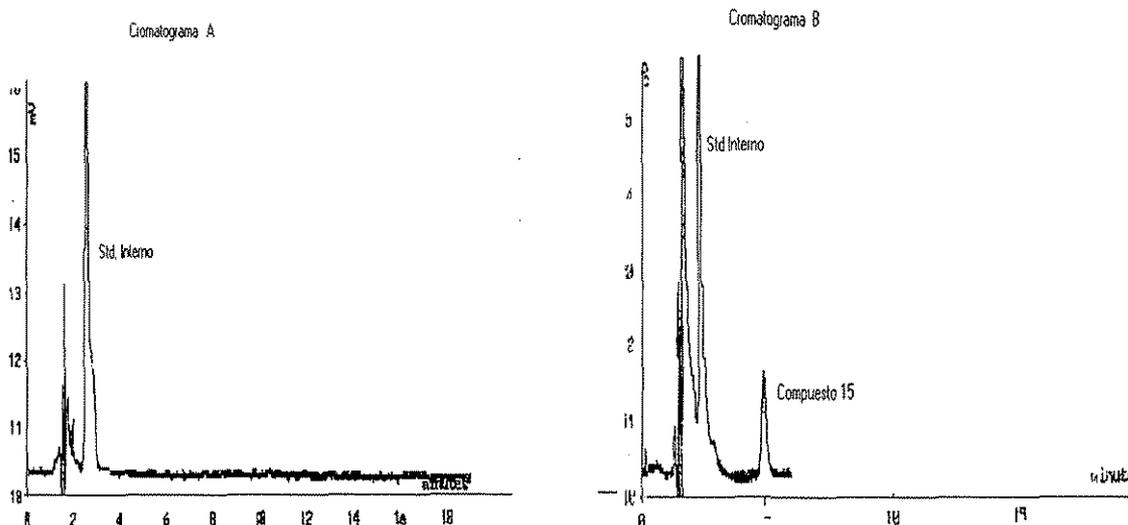


Figura 9.

2. Coeficientes de Distribución (log D) y Partición (logP).

En la Tabla 5, se presentan los coeficientes de distribución (log D) determinados experimentalmente, así como los coeficientes de partición calculados con el programa ACD/Log P versión 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc.) para los compuestos diclorados y el **albendazol**.

Tabla 5. Coeficientes de distribución (Log D) y partición (Log P) determinados para los compuestos **13**, **14** y **15** derivados del 1-metilbencimidazol y el **albendazol**.

Compuesto	Log P calculado*	Log D determinado
Albendazol	3.01 ± 0.86	3.669
13	2.76 ± 0.58	3.216
14	2.25 ± 0.59	3.206
15	3.67 ± 0.63	3.210

* Log P calculado con el programa ACD/ Log P

Algunas propiedades fisicoquímicas obtenidas para los compuestos **13**, **14**, **15** y **albendazol** se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas determinadas para los compuestos **13**, **14** y **15** derivados del 1-metilbencimidazol y el **albendazol**.

Compuesto	Fórmula molecular	P.M	Rf (sistema)	Punto de fusión
Albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ SO ₂	265.33	ND*	ND*
13	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂	215.08	0.24 ^a	197-200
14	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃	216.07	0.01 ^a , 0.34 ^b	246-247
15	C ₈ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	233.12	0.30 ^a	229-232

*ND = No determinado

a) cloroformo-metanol 99:1, 10 ml + 2 gotas de NH₄OH concentrado

b) cloroformo-metanol 80:20, 10 ml + 2 gotas de NH₄OH concentrado

3. Estudios de Permeabilidad.

Es importante indicar que para el **albendazol** se realizaron los estudios de transporte en ambas direcciones (Apical-Basolateral y Basolateral-Apical) sin embargo, debido a los problemas de solubilidad de dicho compuesto en la solución de trabajo y a la poca sensibilidad del método utilizado no fue posible cuantificar su respuesta para alguno de los tiempos de muestreo. Por tal motivo, los resultados obtenidos de los estudios de transporte para el **albendazol** no se presentan.

Con respecto al compuesto **13**, en las Tablas 7 y 8 se presentan las concentraciones de este compuesto en los diferentes tiempos de muestreo determinadas mediante el método analítico previamente validado. Se emplearon en estos estudios de transporte 3 insertos tanto para la dirección Apical/Basolateral (Tabla 7) como Basolateral/Apical (Tabla 8).

Tabla 7. Concentración (ng/mL) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto **13**.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	178.2693	185.6615	193.3869	185.7726 \pm 7.56
30	265.3233	422.9622	494.901	394.3955 \pm 117.42
45	442.9854	*	675.7023	559.3438 \pm 164.56
60	483.940	457.4029	711.1085	550.8171 \pm 139.45
90	678.845	613.1184	892.8303	728.2646 \pm 146.26

DS* = Desviación estándar.

* = Muestra perdida

Tabla 8. Concentración (ng/mL) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto **13**.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	525.2624	252.8234	173.6285	317.2381 \pm 184.46
30	881.8721	784.5161	668.3189	778.2357 \pm 106.91
45	1377.258	1041.293	922.9163	1113.822 \pm 235.69
60	1202.877	1078.169	1164.559	1148.535 \pm 63.88
90	2039.598	1543.925	1633.082	1738.871 \pm 264.23

Las concentraciones obtenidas para el compuesto **13** en los estudios Apical-Basolateral, y Basolateral-Apical en los diferentes tiempos, se representan gráficamente en las figuras 10 y 11 respectivamente.

Figura 10. Cinética de absorción del compuesto **13** determinada del lado apical al basolateral.

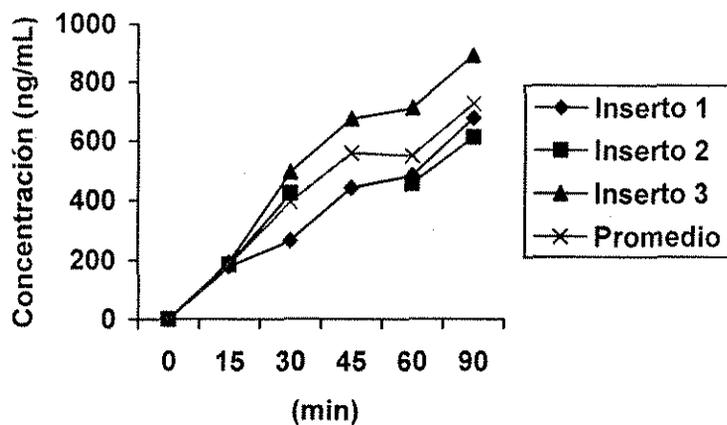
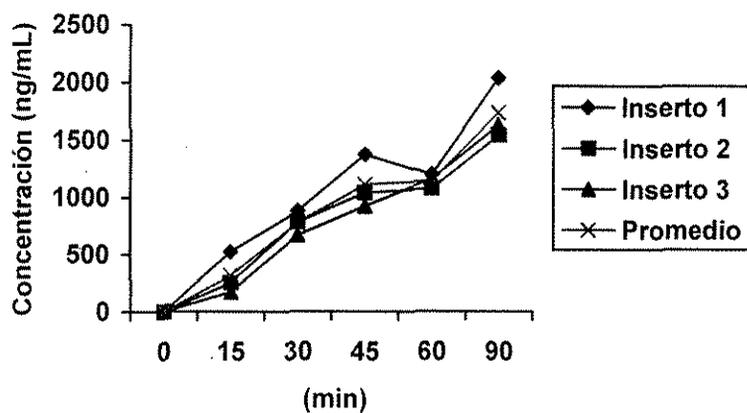


Figura 11. Cinética de absorción del compuesto **13** determinada del lado basolateral al apical.



En las Tablas 9 y 10 se presentan las concentraciones determinadas mediante el método analítico validado para el compuesto **14** en los diferentes tiempos de muestreo a partir de 3 insertos utilizados en el estudio de transporte Apical-Basolateral y Basolateral-Apical respectivamente.

Tabla 9. Concentración (ng/mL) determinada en el estudio de apical a basolateral para el compuesto **14**.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	287.7898	305.5654	247.3375	280.2309 \pm 29.84
30	494.6574	641.4253	449.9324	528.6717 \pm 100.17
45	760.7674	806.534	640.6587	735.9867 \pm 85.67
60	942.0752	1035.488	861.5707	946.378 \pm 87.04
90	1236.268	1354.935	1132.186	1241.13 \pm 111.45

Tabla 10. Concentración (ng/mL) determinada en el estudio de basolateral a apical para el compuesto **14**.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	283.0436	312.7869	370.3916	322.074 \pm 44.41
30	1051.5592	797.371	765.0922	871.3408 \pm 156.91
45	1777.589	1724.515	1477.507	1659.87 \pm 160.14
60	2287.749	2030.109	2062.454	2126.77 \pm 140.35
90	2637.655	2480.565	2913.597	2677.272 \pm 219.22

Las concentraciones obtenidas para el compuesto **14** en los estudios Apical-Basolateral, y Basolateral-Apical en los diferentes tiempos, se representan gráficamente en las figuras 12 y 13 respectivamente.

Figura 12. Cinética de absorción del compuesto **14** determinada del lado apical al basolateral.

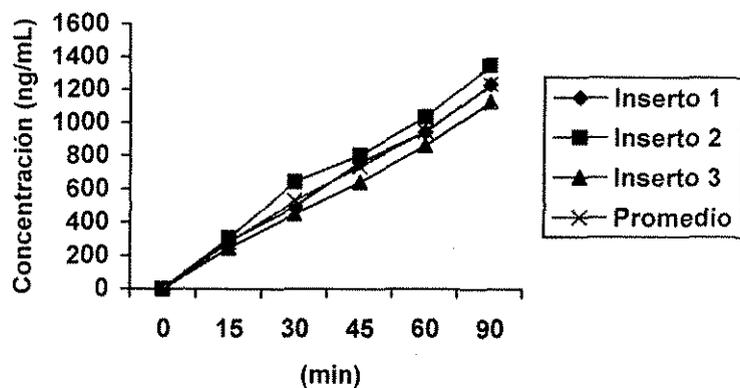
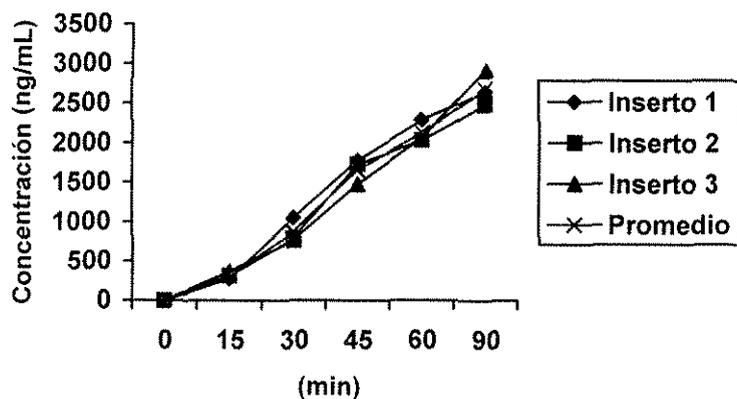


Figura 13. Cinética de absorción del compuesto **14** determinada del lado basolateral al apical.



En las Tablas 11 y 12 se presentan las concentraciones determinadas por el método analítico validado para el compuesto **15** en los diferentes tiempos de muestreo a partir de 3 insertos utilizados en el estudio de transporte Apical-Basolateral y Basolateral-Apical respectivamente.

Tabla 11. Concentración (ng/mL) determinada en el estudio de apical a basolateral para el compuesto **15**.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	146.4322	224.202	225.2566	198.6302 \pm 45.21
30	302.0585	440.9817	444.9766	396.0056 \pm 81.38
45	492.5498	689.9502	604.9839	595.8279 \pm 99.02
60	684.7747	886.446	788.1695	786.4634 \pm 100.85
90	948.2026	1053.666	1053.332	1018.4002 \pm 60.79

Tabla 12. Concentración (ng/mL) determinada en el estudio de basolateral a apical para el compuesto **15**.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS*
0	0	0	0	0
15	164.7369	161.8806	118.1466	148.2547 \pm 26.11
30	857.6349	303.1926	378.5452	513.1242 \pm 300.72
45	1077.477	422.1928	517.3391	672.3361 \pm 354.07
60	1176.147	548.656	693.0343	805.9458 \pm 328.63
90	1579.306	1405.554	1407.766	1464.2087 \pm 99.68

Las concentraciones obtenidas para el compuesto **15** en los estudios Apical-Basolateral, y Basolateral-Apical en los diferentes tiempos, se representan gráficamente en las figuras 14 y 15 respectivamente.

Figura 14. Cinética de absorción del compuesto **15** determinada del lado apical al basolateral.

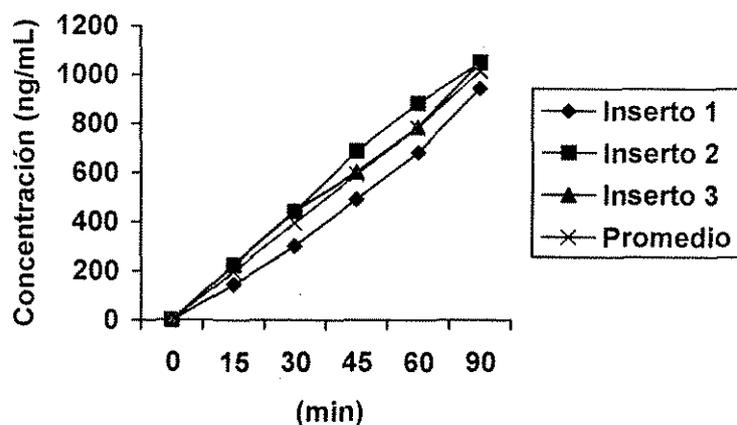
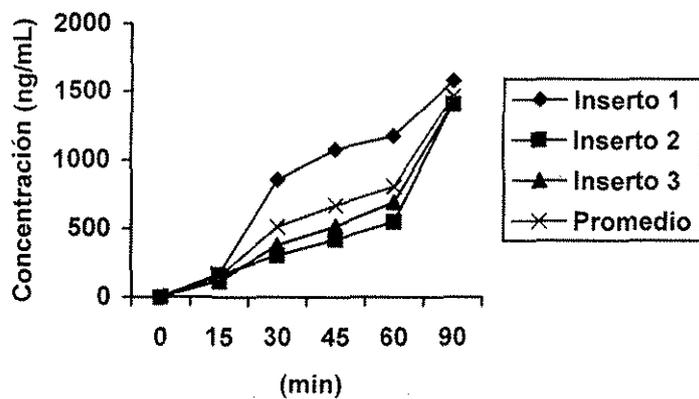


Figura 15. Cinética de absorción del compuesto **15** determinada del lado basolateral al apical.

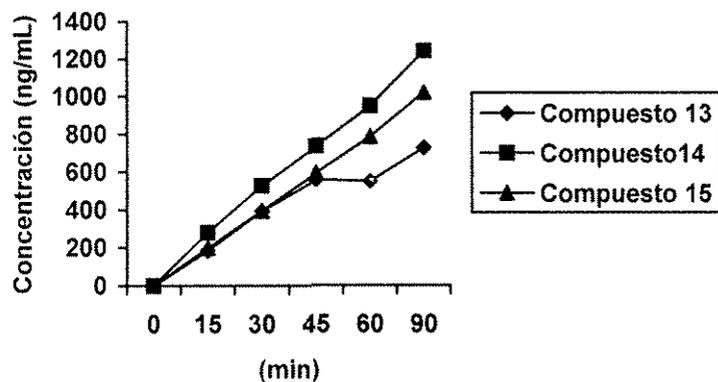


En la Tabla 13 se presentan los valores promedio de los compuestos **13**, **14** y **15** en el estudio del lado Apical al lado Basolateral. La cinética promedio de estos compuestos se representa gráficamente en la figura 16.

Tabla 13. Concentración promedio (ng/mL) obtenida en el estudio de apical a basolateral para los compuestos **13**, **14** y **15**.

Tiempo (min)	Compuesto 13	Compuesto 14	Compuesto 15
0	0	0	0
15	185.7726 ± 7.56	280.2309 ± 29.84	198.6302 ± 45.21
30	394.3955 ± 117.42	528.6717 ± 100.17	396.0056 ± 81.38
45	559.3438 ± 164.56	735.9867 ± 85.67	595.8279 ± 99.02
60	550.8171 ± 139.45	946.378 ± 87.04	786.4634 ± 100.85
90	728.2646 ± 146.26	1241.13 ± 111.45	1018.4002 ± 60.79

Figura 16. Cinética de absorción promedio de los compuestos **13**, **14**, y **15** determinada del estudio de apical a basolateral.



Como se puede observar en la Tabla 13 y en la figura 16, el compuesto que se absorbe mejor es el **14**, seguido del compuesto **15** y **13**.

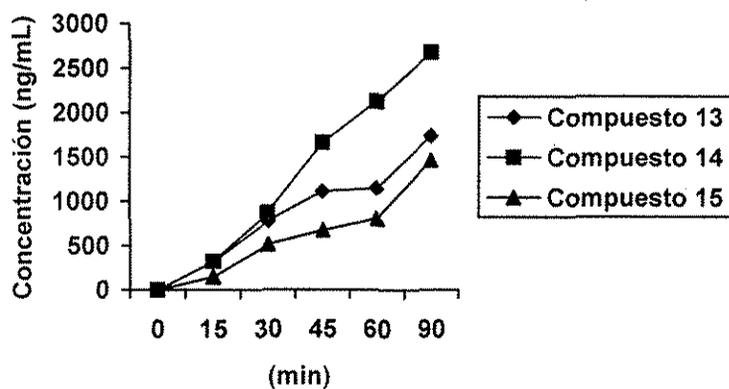
En la Tabla 14 se presentan los valores promedio de los compuestos diclorados en el estudio del lado Basolateral al lado Apical. La cinética promedio de estos compuestos se representa gráficamente en la figura 17.

El compuesto que se absorbe más rápidamente es el **14**, siendo el compuesto **15** el que menos se absorbe a los tiempos evaluados.

Tabla 14. Concentración promedio (ng/mL) determinada en el estudio de basolateral a apical para los compuestos **13**, **14** y **15**.

Tiempo (min)	Compuesto 13	Compuesto 14	Compuesto 15
0	0	0	0
15	317.2381 ± 184.46	322.074 ± 44.41	148.2547 ± 26.11
30	778.2357 ± 106.91	871.3408 ± 156.91	513.1242 ± 300.72
45	1113.822 ± 235.69	1659.87 ± 160.14	672.3361 ± 354.07
60	1148.535 ± 63.88	2126.77 ± 140.35	805.9458 ± 328.63
90	1738.871 ± 264.23	2677.272 ± 219.22	1464.2087 ± 99.68

Figura 17. Cinética de absorción promedio de los compuestos **13**, **14**, y **15** determinada del estudio de basolateral a apical.



Integridad de las monocapas celulares (Papp del Amarillo de lucifer).

Valores de Papp* obtenidos para el amarillo de lucifer (AL) con las monocapas utilizadas en los estudios de transporte Apical a Basolateral (1-3) y Basolateral-Apical (4-6) de los compuestos diclorados **13**, **14** y **15** y del **albendazol**.

Compuesto	1	2	3	4	5	6
13	5.2E-08	5.2E-08	4.4E-08	7.5E-08	5.9E-08	7.2E-08
14	4.1E-08	4.1E-08	4.6E-08	7.3E-08	7.1E-08	8.5E-08
15	2.0E-08	2.4E-08	2.7E-08	2.9E-08	2.3E-08	2.3E-08
Albendazol	1.4E-08	2.6E-08	6.4E-08	2.6E-08	2.0E-08	2.8E-08

Papp* = Coeficiente de permeabilidad aparente promedio (cm/s)

4. Coeficiente de Permeabilidad Aparente.

En la Tabla 15 se presentan los coeficientes de permeabilidad aparente de los compuestos **13**, **14** y **15** calculados con la fórmula mencionada en la metodología.

Tabla 15. Coeficiente de Permeabilidad Aparente (Papp) obtenido de los compuestos **13**, **14** y **15**.

Compuesto	Papp (x 10 ⁻⁵ cm/s) Apical a Basolateral ± DS	Papp (x 10 ⁻⁶ cm/s) Basolateral-Apical ± DS
13	1.803 ± 5.37E-06	8.894 ± 1.19E-06
14	2.406 ± 4.56E-06	9.913 ± 1.78E-06
15	1.657 ± 3.40E-06	5.367 ± 3.14E-06

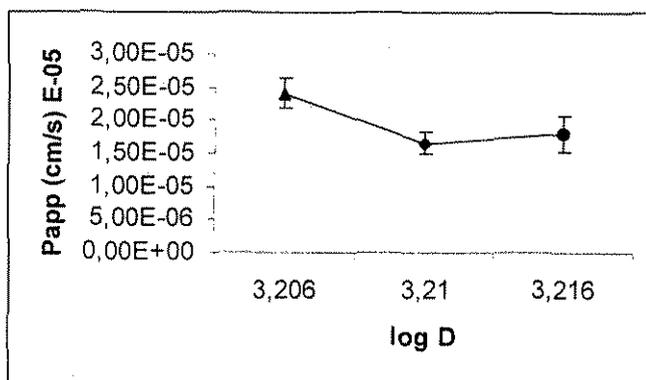
El compuesto con Papp más alto en la cinética de apical a basolateral es el compuesto **14**, y con valores de Papp muy cercanos le siguen el compuesto **13** y **15**.

Sin embargo, en la cinética de absorción de basolateral a apical, los compuestos **13** y **14** tuvieron los valores de Papp más altos, siendo muy cercanos (8.894 y 9.913 x 10⁻⁶ cm/s respectivamente), el compuesto **15** presentó un Papp menor (5.367 x 10⁻⁶ cm/s).

5. Coeficiente de permeabilidad aparente como una función de la lipofilidad.

Para determinar si los grupos CH₃, NH₂ y SH introducidos en la posición 2 del anillo bencimidazol (compuestos **13**, **14** y **15** respectivamente), tienen algún efecto sobre el coeficiente Papp, se correlacionaron los valores obtenidos de logD con respecto a los valores obtenidos de coeficiente Papp del lado Apical a Basolateral (figura 18).

No se observó una buena correlación entre estos dos parámetros ($r = -0.69$)



- ▲ Compuesto 14
- ◆ Compuesto 15
- Compuesto 13

Figura 18. Correlación entre el coeficiente Papp y el coeficiente de distribución (log D) de los compuestos **13**, **14** y **15**.

DISCUSION DE RESULTADOS

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Para realizar estudios de transporte utilizando a la línea celular Caco-2 como modelo biológico *in vitro* se puede utilizar alguno de dos sistemas:

- a.- Sistema Transwell
- b.- Sistema Snapwell

En este estudio, se planteó inicialmente utilizar el sistema snapwell para realizar los estudios de transporte y determinar el coeficiente de Papp de los compuestos diclorados y del **albendazol**. Sin embargo, se detectó un problema de adsorción de los diferentes compuestos (alrededor del 50%) a las paredes de las cámaras de difusión que contienen los insertos con las células y que reciben los fluidos en el lado apical y basal. Por lo que, en su lugar se implementó un sistema tipo transwell, utilizando los insertos snapwell. En este sistema implementado se emplearon cajas de cultivo tisular sobre las cuales se colocaron los insertos para tener acceso a ambos lados de la monocapa y realizar la determinación Apical/Basolateral y Basolateral/Apical.

Aún cuando las condiciones de los estudios de transporte correspondieron a las de un sistema transwell, es más correcto hablar de una combinación de los dos sistemas, con la ventaja de contar con insertos que por ser de mayor diámetro en su parte superior permitieron una mayor iluminación de la monocapa evitando el riesgo de romperla durante la toma de muestras. Además, los pozos sobre los cuales se colocaron los snapwell son de mayor tamaño que los correspondientes para los transwell, esto facilitó la toma de muestras a partir del pozo evitando el riesgo de mover el inserto lo que ocasionaría que las soluciones apical y basolateral se mezclaran afectando indudablemente los resultados obtenidos.

Caco-2 es una línea celular que a pesar de tener su origen en un carcinoma colorectal humano, verdaderamente es muy similar a los enterocitos del intestino delgado con respecto a su estructura y funcionalidad. Al igual que las células del epitelio intestinal, Caco-2 presenta complejos de unión (constituídos por uniones estrechas, intermedias y desmosomas) por medio de los cuales las células se unen; sin embargo, dichas uniones son más cerradas y semejantes a las del intestino grueso que a las del intestino delgado, por ello, la permeabilidad paracelular (entre las células) de Caco-2 es parecida a la del epitelio colónico. Dado que los complejos de unión representan una barrera para la ruta paracelular, es importante verificar su integridad (integridad de la monocapa) como una prueba de control de calidad.

Con el objetivo de verificar la integridad de las monocapas y garantizar que los Papp obtenidos no estuvieran afectados por la ruptura de las uniones celulares, se determinó la permeabilidad al amarillo de lucifer que es una molécula soluble en agua. Este parámetro es importante, ya que las medidas de resistencia eléctrica son menos sensibles a pequeños cambios en la permeabilidad epitelial.

De esta forma la integridad de las monocapas se verificó al final de cada experimento al determinar el transporte transepitelial del amarillo de lucifer. Únicamente aquellas monocapas para las cuales el amarillo de lucifer hubiese obtenido un Papp $< 1 \times 10^{-7}$ cm/s fueron utilizadas para determinar la cinética del proceso de permeabilidad.

A partir de los Papp obtenidos para el amarillo de lucifer es evidente que todas las monocapas utilizadas cumplieron con el parámetro establecido, lo cual nos indica dos cosas:

- La integridad de las monocapas no únicamente se mantuvo a lo largo de los estudios de transporte, sino además, se desarrolló una excelente barrera para moléculas pequeñas.
- El manejo de Caco-2 desde el momento de su cultivo hasta el final de los estudios fue adecuado, pues de lo contrario no se hubiese logrado la formación y mantenimiento de las monocapas celulares.

Cabe mencionar que en este estudio se empleó al **albendazol** como compuesto de referencia considerando que es un compuesto de amplio uso en el tratamiento de infecciones parasitarias tanto intestinales como extraintestinales, pero que tiene una biodisponibilidad baja. Por lo que se validó el método analítico para su cuantificación en las muestras obtenidas a partir de los estudios de transporte realizados con la línea celular Caco-2. El coeficiente de permeabilidad aparente y la cinética del proceso de permeabilidad para el **albendazol** no se pudo determinar, pues la cuantificación del área del compuesto a los diferentes tiempos muestreados cayó por abajo del límite de cuantificación, el cual no pudo ser disminuido debido a la poca sensibilidad del método utilizado.

Con respecto a la concentración acumulada de los compuestos **13**, **14** y **15** a través del tiempo del lado apical al basolateral (figuras 10, 12, 14), la linealidad de las gráficas indica que a la concentración empleada no hubo saturación en el transporte de los compuestos diclorados. Sin embargo, para determinar si el transporte de estos compuestos ocurre por un proceso de difusión pasiva o activa, se necesita estudiar el efecto de la concentración en la velocidad de permeabilidad. Así, si el proceso es pasivo la relación concentración vs velocidad de permeabilidad será lineal y directa, pero si el proceso es activo se llegará a una concentración por arriba de la cual la velocidad de permeabilidad se mantendrá constante.

La diferencia estructural entre los compuestos **13**, **14** y **15** radica únicamente en el sustituyente en la posición 2 en la molécula; por lo tanto, es en función de él que se establecen las diferencias de polaridad, solubilidad y permeabilidad.

La polaridad es una propiedad de nuestro interés dado que en virtud de ella se establecen las características de solubilidad para los compuestos no iónicos (52). Las sustancias no polares o débilmente polares se disuelven en disolventes no polares o ligeramente polares, mientras que los compuestos muy polares lo hacen en disolventes de alta polaridad (como el agua) (52,53). La polaridad de una molécula depende de la polaridad de sus enlaces, de la forma de la molécula y de los pares de electrones no compartidos (52).

Un enlace covalente es polar cuando une a dos átomos que difieren en su tendencia por atraer electrones; es decir, que difieren en su electronegatividad. De manera que entre mayor sea la diferencia en electronegatividad tanto más polar será el enlace. De los elementos que se encuentran en química orgánica la electronegatividad de mayor a menor es como sigue: $F > O > Cl, N > Br > C, H$ (52).

En moléculas en las que esperaríamos que los enlaces individuales fuesen polares un arreglo altamente simétrico como es el tetrahédrico puede generar momentos dipolares nulos (52).

Los pares de electrones no compartidos contribuyen con un momento dipolar en dirección opuesta al momento neto de los enlaces; estos momentos contrarios son casi de la misma magnitud (52).

Al analizar la estructura química de los compuestos diclorados de acuerdo con los conceptos citados, consideramos lo siguiente:

1. El sustituyente metilo (compuesto **13**) es un grupo no polar debido a la falta de polaridad de sus enlaces covalentes C-C (por medio del cual se une al resto de la molécula) y C-H; a la falta de pares de electrones no compartidos y a la geometría tetrahédrica del grupo. En consecuencia, el compuesto **13** es el de menor polaridad.
2. El sustituyente tio (compuesto **15**) presenta dos uniones covalentes el enlace S-H y el enlace S-C (por medio del cual se une al resto de la molécula); sin embargo, la diferencia en electronegatividad entre el S-H y S-C no es de gran relevancia; no obstante, debido a los pares de electrones no compartidos del S es probable que la suma de los momentos de enlace individuales se vea aumentada dando lugar a la obtención de una molécula de mayor polaridad que el compuesto **13**.
3. El sustituyente amino (compuesto **14**) es el de mayor polaridad debido a la polaridad de sus enlaces N-C (por medio del cual se une al resto de la molécula) y N-H, y a la deslocalización del par de electrones no compartido del N, acentuándose una carga positiva. En consecuencia, el grupo amino le confiere al compuesto **14** una mayor polaridad.

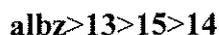
De acuerdo con el análisis, la polaridad de mayor a menor para los compuestos diclorados es la siguiente:



Además, estos compuestos son más polares que el **albendazol**, cuya polaridad se ve disminuída por el sustituyente de la posición 5.

Los coeficientes de distribución lípido/agua (logD) obtenidos para los compuestos diclorados y el **albendazol** reflejan la estrecha relación que existe entre la estructura química de los compuestos y sus propiedades fisicoquímicas (52,53). Es decir, entre más polar es el sustituyente y por ende la molécula, mayor será la difusión hacia la fase acuosa que hacia la fase orgánica, en consecuencia, la relación lípido/agua será menor, lo contrario sucede para una molécula de menor polaridad, cuya difusión hacia la fase acuosa será menor que hacia la fase orgánica dando como resultado una relación lípido/agua mayor.

En conclusión, el log D para los compuestos diclorados y el **albendazol** de mayor a menor valor es el siguiente:



Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos de coeficiente de Papp, se observa que el compuesto **14** obtuvo el Papp de mayor valor (2.406×10^{-5} cm/s) siendo el más polar de los compuestos diclorados, lo que nos permite suponer que su mayor solubilidad en disolventes polares favoreció su permeabilidad transmembrana ya que únicamente los compuestos disueltos en los fluidos biológicos o en este caso en la solución transportadora de Hanks' se encontrarían disponibles para atravesar la membrana epitelial (20).

En el caso de los compuestos **13** y **15**, el valor de Papp para ambos compuestos fue de 1.803 y 1.657×10^{-5} cm/s respectivamente. El compuesto **15** es más polar que el compuesto **13**, sin embargo esta característica parece no haber influido de manera importante en la permeabilidad del compuesto

A partir de este análisis se pone de manifiesto que en la permeabilidad de un compuesto participan diferentes factores fisicoquímicos que afectan su transferencia a través de las membranas celulares (naturaleza química, pKa y grado de ionización, peso molecular, pH en el sitio de absorción, etc) y no únicamente su solubilidad o lipofiliidad (13,19,20).

A este respecto, la falta de correlación entre el log D y el coeficiente Papp de cada uno de los compuestos revela como se ha demostrado en varios estudios (10,54) que la lipofiliidad de un compuestos no predice su absorción, ya que si bien es cierto que entre más lipofílica sea una molécula más fácilmente se particionará dentro de las membranas celulares lipídicas, también es cierto que su velocidad de disolución resultará afectada debido a la polaridad de los fluidos biológicos (agua). Así tenemos que para compuestos polares la absorción estará limitada por su paso a través de las membranas celulares lipídicas, mientras que para compuestos no polares (lipofílicos) la absorción estará limitada por su velocidad de disolución en los fluidos biológicos.

La absorción en humanos de diferentes fármacos después de su administración oral ha sido expresada en función de los valores Papp, obteniéndose una buena correlación (10,11,12). Así, los fármacos que se absorben en un 80-100% en humanos tuvieron valores Papp aproximadamente mayores a 1×10^{-6} cm/s, mientras que los fármacos que se absorben en un porcentaje menor tuvieron valores Papp menores a 1×10^{-6} cm/s.

De acuerdo con lo anterior los valores de coeficiente Papp de los compuestos diclorados fueron mayores a 1×10^{-6} cm/s lo que permite suponer que éstos se absorban en 80-100% al ser administrados *in vivo*.

Así mismo, los resultados obtenidos sugieren que la absorción *in vivo* de los compuestos **13**, **14** y **15** será mayor que la del **albendazol**. El hecho de no haberse podido cuantificar el paso del **albendazol** a través de la monocapa celular, sugiere por un lado que el **albendazol** es menos permeable que los compuestos **13**, **14** y **15**, sin embargo, su menor solubilidad pudo haber sido el factor limitante en su paso a través de la monocapa.

Es importante mencionar que en un estudio posterior realizado en los laboratorios Absorption System (E.U.) con el asesoramiento del Dr. Ismael Hidalgo, y empleando otras condiciones cromatográficas, se determinó el Papp de las cuatro series

de moléculas nuevas derivadas del 1-metilbencimidazol, entre las cuales se encontraban los compuestos **13**, **14** y **15** evaluados en este estudio.

En ese estudio se emplearon diferentes condiciones cromatográficas, equipo HPLC, sistema utilizado para realizar los experimentos de transporte, concentración inicial, etc. Sin embargo, es evidente que al igual que en nuestro estudio el compuesto **14** tuvo el valor de Papp mayor, seguido del compuesto **13** y del **15**. Además, aun cuando los Papp obtenidos en nuestro estudio fueron menores a los reportados por el estudio realizado en E.U., en ambos casos los compuestos diclorados caen en la categoría de los compuestos que se absorben en un 80-100% en humanos después de su administración oral.

El Papp del **albendazol** obtenido en el estudio realizado en E.U., es menor que el de los compuestos diclorados, lo que confirma la hipótesis establecida en nuestro estudio.

Con la determinación del Papp de los compuestos **13**, **14** y **15** empleando un método analítico que no fue validado de acuerdo a los criterios y normas establecidas para métodos biológicos se avanzó en la caracterización de estos compuestos, habiéndose demostrado que tienen buenas características de permeabilidad. Sin embargo, lo ideal es utilizar un método analítico validado de acuerdo a los criterios y normas establecidas para métodos biológicos quedando por evaluar además su eficacia antiparasitaria *in vivo*.

El empleo de Caco-2 es una alternativa útil a los modelos *in vivo* e *in situ* para el estudio de la absorción intestinal de fármacos.

Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas de Caco-2 es importante no olvidar que esta línea celular es de origen canceroso y colónico con propiedades de diferentes partes del epitelio intestinal que incrementan la posibilidad de una diferencia a partir de las células intestinales normales; carece de la capa de mucus-gel que se puede unir a los fármacos y disminuir su absorción y los experimentos de absorción se pueden realizar bajo condiciones donde el metabolismo del fármaco puede quedar excluido debido a que no todas las hidrolasas del borde en cepillo que han sido identificadas en el intestino delgado humano están presentes en las células Caco-2, además, la mayoría de las enzimas y transportadores identificados están subexpresados.

Actualmente, se dispone de una clona de Caco-2 que necesita únicamente de una semana para su diferenciación enterocítica y presenta la capa de mucus-gel. Estas características, nos permitirían por un lado acortar el tiempo necesario para iniciar los estudios de transporte, y por otro lado estudiar el efecto de la capa de mucus-gel en la absorción de los compuestos, obteniéndose así valores de Papp en condiciones más cercanas a las reales.

CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

- 1) Los compuestos **13**, **14** y **15** tienen un coeficiente de permeabilidad aparente mayor a 1×10^{-6} cm/s por lo que caen en el intervalo de los compuestos considerados con buena permeabilidad.
- 2) El transporte de los compuestos **13**, **14** y **15** a través de la línea Caco-2 empleando la concentración 100 μ M, se lleva a cabo por un mecanismo de difusión.
- 3) No hubo correlación ($r = -0.69$) entre los coeficientes de Papp y los coeficientes de distribución lípido/agua (Log D) de los compuestos **13**, **14** y **15**.

BIBLIOGRAFIA

X. BIBLIOGRAFIA

- 1 Cedillo-Rivera R. Parasitosis Intestinales. En: Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. (Eds). Manual de Infectología, 12ª edición, Ed. Francisco Méndez Cervantes, México, D.F., 1990: 99-109.
- 2 Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. (Eds). Manual de Infectología Clínica, 14ª edición, Méndez Editores, México, D.F. 1994.
- 3 Jung H, Sánchez M, Medina MT, Hurtado M, Sotelo J. (1992). Clinical Pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cisticercosis. *J Clin Pharmacol.* 32:28-31.
- 4 Prieto JG, Justel A, Del Estal JL, Barrio JP and Alvarez AI. (1991). Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comp Biochem Physiol.* 100C (3):397-400.
- 5 Villaverde C, Alvarez AI, Del Estal JL, Prieto JG (1992) Albendazole and Mebendazole Uptake by Isolated Enterocytes. *Dev Pharmacol Ther.* 19:27-31.
- 6 Q.B. Sánchez DMR (1999). Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 7 Cárdenas RHL, Cortés AAR. (1996) Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Unidad 1. Biofarmacia: antecedentes y aspectos generales. 1ª edición. Edit. UAM Xochimilco.
- 8 Artursson P (1990) Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorbative (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci.* 79(6):476-482.
- 9 Hidalgo IJ, Raub ThJ, and Borchardt RT. (1989) Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology.* 96:736-749.
- 10 Artursson P. and Karlsson J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 175(3) 880-885.
- 11 Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, and Sezaki H. (1997) Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting *in vivo* drug absorption. *Pharm Res.* 14(4):486-491.
- 12 Yee S. (1997) In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man-fact or myth. *Pharm Res.* 14(6): 763-766.

- 13 Gibaldi M. (1991) *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 4ª ed. Edit. LEA FEBIGER.
- 14 Guyton AC. (1989) *Tratado de Fisiología Médica*. 7ª ed. Edit. Interamericana. McGraw-Hill
- 15 Gibaldi M. (1974) *Introducción a la Biofarmacia*. Traducción por el Profesor. Dr. Cabo TJ. Edit. Acribia. Zaragoza (España).
- 16 Muñoz MEJ, García X. (1998) *Fisiología: células, órganos y sistemas V. 4. Unidad VII. Sistema digestivo*. 1ª ed. Ediciones Científicas Universitarias.
- 17 Best ChH, Taylor NB. (1982) *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. Unidad 8. Secreción, digestión y absorción en el intestino. 10ª ed. Edit. Médica Panamericana.
- 18 Tadataka Yamada MD. (1991) *Textbook of Gastroenterology V.I. Capítulo 6. Epithelia: Biologic Principles of Organization*. Edit. J. B. Lippincott Company.
- 19 Benet LZ, Mitchell JR, Sheiner LB. *Farmacocinética: Dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos*. En: Goodman Gilman A. (1991) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 8ª ed. Edit. Médica Panamericana.
- 20 Jean-Pierre Labauna. *Manual de Farmacocinética*. Versión española de Camarasa GJ, Escubedo RE. Edit. Masson.
- 21 Hsieh DS. (1994) *Series: Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Drug Permeation Enhancement. Theory and Applications. V.62. Edit. Marcel Dekker, Inc.
- 22 Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL and Hirst BH. (1993) Functional Expression of P-glycoprotein in Apical Membranes of Human Intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 268(20): 14991-14997.
- 23 Banker GS, Rhodes ChT, (1996) *Series: Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Modern Pharmaceutics. V.72. 2ª ed. Edit. Marcel Dekker, Inc.
- 24 W. Forth Bochum and W. Rummel Humburg/Saar. (1975) *Serie: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics; section 39B. Pharmacology of Intestinal Absorption: gastrointestinal absorption of drugs*. V. I. 1ª . Ed
- 25 Rabinowitz JL, Myerson RM.(1971) *Absorption Phenomena*. Edit. Wiley-Interscience.
- 26 Bar WH. and Riegelman S. (1970) Intestinal Drug Absorption and Metabolism I: Comparison of Methods and Models to Study Physiological Factors of *In Vitro* and *In Vivo* Intestinal Absorption. *J Pharm Sci*. 59(2): 154-163.

- 27 Bochum WF and Humburg/Saar WR. (1975) *Serie: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics; section 39B*. Pharmacology of Intestinal Absorption: gastrointestinal absorption of drugs. V. II. 1^a. Ed
- 28 Wilson TH and Wiseman G. (1954) The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*. 123:116-125.
- 29 Raúl F, Kedinger M, Simón P, Grenier J and Haffen K. (1978) Behaviour of Isolated Rat Intestinal Cells Maintained in Suspension or Monolayer Cultures. *Biol Cellulaire*. 33:163-168.
- 30 Code ChF, Heidel W. (1968) *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System, V. IV. Cultured Intestinal Cells*. Edit. American Physiological Society, Washington, D.C.
- 31 Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, and Russell GJ. (1999). MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J Pharm Sci*. 88(1):28-33.
- 32 Fogh J, Fogh JM, and Orfeo Th. (1977) One Hundred and Twenty Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *J. Natl Cancer Inst*. 59(1):221-226.
- 33 Leibovitz A, Stinson JC, McCombs III WB, McCoy CE, Mazur KC, and Mabry ND. (1976) Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res*. 36:4562-4569.
- 34 Pinto M, Robine-Leon S, (1983) Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biol Cell* 47:323-330.
- 35 Artursson P and Magnusson Ch. (1990) Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. II: Effect of Extracellular Calcium Concentration on the Paracellular Transport of Drugs os Different Lipophilicities across Monolayers of Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci*. 79(7):595-600.
- 36 Knipp GT, Norman F. H. Ho, Barsuhn CL, and Borchardt RT. (1997) Paracellular Diffusion in Caco-2 Cell Monolayers: Effect of Perturbation on the Transport of Hydrophilic Compounds that Vary in Charge and Size. *J Pharm Sci*. 86(10):1105-1110
- 37 Sharma S. (1994) Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Adv Drug Res*. 25:103-172.
- 38 Ramalingam S, Sinniah B, and Krishnan V. (1983). Albendazole an effective single dose, broad-spectrum anthelmintic drug. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 32:944-984.

- 39 McCracken RO.(1978). Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *J Parasitol.* 64 (2):214-219.
- 40 Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. (1988). Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. *Arch Neurol.* 45:532-534.
- 41 Gyurik R, Chow AW, Zaber B, Brunner EL, Miller JA, Villani AJ, Petka LA. and Parish RC. (1981) Metabolism of albendazole in cattle sheep, rats and mice. *Drug Metab. Disp.* 9:503-508.
- 42 Marriner SE and Bogán JA. (1980) Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am-J. Vet. Res.* 41:1126-1129.
- 43 Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina MT, Sotelo J.(1990). Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharm.* 13:559-564.
- 44 Jung H, Medina L, García L, Fuentes I and. Moreno-Esparza R. (1998) Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:43-48.
- 45 Marriner SE, Morris DL, Dickson B, Bogan JA. (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30:705-708.
- 46 Michiels M, Hendriks R, and Heykants J. (1982). The pharmacokinetics of mebendazole to flubendazole in animals and man. *Arch Int. Pharmacodyn.* 256:180-191.
- 47 Escobedo F, Penagos P, Rodríguez J, Sotelo J.(1987). Albendazole Therapy for neurocysticercosis. *Arch Intern Med.* 147:738-741.
- 48 Lauge H, Eggers R, Bincher J. (1988) Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 34:315-317.
- 49 Cedillo-Rivera R, Muñoz O. J. (1992) In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol.* 37:221-224.
- 50 Manual de Validación de Métodos Analíticos, editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México.
- 51 The Pharmacopoeia of the United States of America XXIII United States Convention. Inc. USA, 1995.
- 52 Morrison RT y Boyd RN (1987) Química Orgánica. 2ª ed. en español. Edit. Addison-Wesley Iberoamericana.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 53 Masterton WL, Slowinski EJ, Stanitski CL. (1989) Química General Superior 6^a ed. Edit. McGraw-Hill.
- 54 Martin YC. (1981) A Practitioner's Perspective of the Role of Quantitative Structure-Activity Analysis in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 24:229-237.