

MODELIZACION DE LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN INTESTINAL "IN SITU" DEL SALBUTAMOL EN RATA

Belén Valenzuela¹, Elsa López Pintor¹, Adela Martín-Villodre³, Amparo Nácher³, Juan J. Pérez-Ruixo^{1,2}, Vicente G. Casabó³

¹ División de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Departamento de Ingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche

² Global Clinical Pharmacokinetics & Clinical Pharmacology. Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development.

³ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia

Resumen / Abstract

Objective: To develop a semiphysiological population pharmacokinetic model to describe the salbutamol gut absorption in rats.

In situ techniques were used to characterize the salbutamol gut absorption in twelve groups of eight Wistar rats. Salbutamol was administered in absence and presence of competitive (verapamil and grapefruit juice) and metabolic (sodic azid) inhibitors. Salbutamol absorption was modelled as a first-order passive process from the gut to the enterocyte, followed by ATP-dependent secretion from enterocyte to the gut. Verapamil and grapefruit juice are modelled as competitive inhibitors of the ATP-dependent secretion process. The sodic azid inhibits the ATP production in the enterocyte, as a consequence, the active secretion process is blocked.

Population pharmacokinetic modeling is a useful tool to integrate the *in situ* data and to better understand the drug absorption process.

Introducción

El salbutamol es un agonista β -2 adrenérgico utilizado para el tratamiento de procesos asmáticos y trastornos pulmonares obstructivos. Cuando se administra por vía oral, su biodisponibilidad es escasa y variable (10-50%), debida, en parte, a procesos de secreción mediados por la glicoproteína P intestinal (P-gp). Estudios previos (1) han puesto de manifiesto la existencia de procesos de secreción activa en la

absorción intestinal de salbutamol en rata. Estos procesos podrían influir en la escasa biodisponibilidad de este fármaco por vía oral, puesto que la adición de diferentes inhibidores de la P-gp y de transportadores activos en general, junto con el salbutamol, mejoran el rendimiento neto de la absorción del fármaco.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo poblacional semifisiológico que describa la absorción intestinal del salbutamol y los factores que determinan su variabilidad inter e intraindividual.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio. El estudio del mecanismo de absorción intestinal del salbutamol se desarrolló mediante ensayos de absorción en ratas Wistar, siguiendo una técnica de perfusión *in situ* (2), que utiliza soluciones isotónicas con la sangre.

En primer lugar se perfundieron siete soluciones isotónicas del fármaco a las concentraciones 0.15, 0.29, 1.20, 5.00, 9.00, 13.00 y 18.00 mM. Para cada condición de ensayo se utilizaron 8 animales. Con el fin de detectar la existencia de un posible fenómeno de secreción activa del fármaco al lumen intestinal, los ensayos de inhibición se realizaron empleando:

a) un inhibidor específico de la P-gp, el verapamilo. Se perfundieron soluciones mixtas de salbutamol, a la concentración de 0.29 mM (equivalente a la dosis alométrica en humanos), y verapamilo a las concentraciones diferentes 10 y 20 mM.

b) un inhibidor metabólico, la azida sódica. Se perfundieron soluciones mixtas de azida sódica y salbutamol en el intestino delgado completo de la rata. La concentración de salbutamol (0.29 mM) se mantuvo constante y se adicionó la azida sódica en concentraciones crecientes: 0.3, 3 y 6 mM.

c) un inhibidor natural, el zumo de pomelo en presencia de salbutamol 0.29 mM. El zumo se adicionó diluido con agua al 50%.

Tiempos de muestreo y técnica analítica. En cada rata, se cuantificó la concentración remanente de salbutamol a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos tras la administración del fármaco. La determinación del salbutamol se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección por fluorescencia de acuerdo con un procedimiento descrito con anterioridad (1).

Software. El análisis farmacocinético se realizó mediante el método no lineal de efectos mixtos implementado en el programa NONMEM (3). La exploración de los resultados obtenidos, incluyendo los gráficos de bondad de ajuste se llevo a cabo con el programa S-PLUS, versión 6.0.

Desarrollo de Modelo Farmacocinético. Para proceder al ajustado se ha utilizado una ecuación matemática en la que se asume que el salbutamol se absorbe de forma pasiva, siguiendo una cinética de primer orden, caracterizada por la constante de velocidad de absorción, k_a . Una vez alcanzado el enterocito, el salbutamol sufre un proceso de secreción activa hacia el lumen intestinal. La secreción activa es un proceso dependiente de ATP, caracterizado por la velocidad máxima de secreción (V_{ms}) y la constante de Michaelis-Menten (K_{ms}). Estos procesos quedan caracterizados mediante la Ecuación 1:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{V_{ms} \cdot [ATP]_R \cdot A}{K_{ms} + A} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde, A es la concentración de fármaco en el lugar de absorción a tiempo t, y $[ATP]_R$ es la cantidad relativa de ATP, que en ausencia de inhibidores metabólicos es igual a 1. Debe

indicarse que en el proceso de secreción, A, debería sustituirse por A' , que sería la concentración en el enterocito, pero, puesto que se desconoce, se ha sustituido por la concentración en lumen.

En presencia de inhibidores competitivos, como el verapamilo y el zumo de pomelo, la Ecuación 1 adopta la siguiente expresión:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{V_{ms} \cdot A}{K_{ms} \left[1 + \frac{I}{K_{mI}} \right] + A} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde I es la concentración de inhibidor y K_{mI} es la constante de Michaelis-Menten del proceso de secreción del inhibidor. La imposibilidad de conocer la concentración exacta del zumo de pomelo, hace que K_{mI} no pueda estimarse de forma independiente y, por tanto, el factor $1+(I/K_{mI})$ se estima como un único parámetro denominado PK_m.

En ausencia de inhibidores metabólicos, se asume que el ATP en el interior del enterocito se produce constantemente de acuerdo con una cinética de orden 0, caracterizada por la constante K_1 , y se elimina según un proceso de primer orden caracterizado por la constante K_0 (Ecuación 3):

$$\frac{dATP}{dt} = k_1 - k_0 \cdot [ATP] \quad \text{Ecuación 3}$$

En estado estacionario, la concentración de ATP ($[ATP]_{ss}$) es constante respecto al tiempo y, por tanto, $[ATP]_{ss}$ es igual al cociente K_1/K_0 . Al no disponerse de datos experimentales de $[ATP]_{ss}$ es necesario modelizar el cambio relativo de la $[ATP]$ ($[ATP]_R$) respecto a su valor basal $[ATP]_{ss}$. De tal forma que a $t=0$, $[ATP]/[ATP]_{ss}$ será igual a 1, y entonces K_1 es igual a K_0 . En esta situación, la Ecuación 1 adopta la siguiente expresión:

$$\frac{d[ATP]_R}{dt} = k_0 - k_0 \cdot [ATP]_R \quad \text{Ecuación 4}$$

En presencia de azida sódica, se produce una inhibición de la enzima ATP sintetasa, de tal forma que la evolución temporal de $[ATP]_R$ puede expresarse mediante la Ecuación 5:

$$\frac{d[ATP]_R}{dt} = k_0 \cdot \left(1 - \frac{AZ}{IC_{50} + AZ}\right) - k_0 \cdot [ATP]_R \quad \text{Ecuación 5}$$

donde k_0 es la constante de eliminación del ATP, AZ es la concentración de azida sódica en el medio, IC_{50} es la concentración de azida sódica que produce el 50% de inhibición de la actividad de la ATP sintetasa, y $[ATP]_R$ es la concentración relativa de ATP disponible a tiempo t.

La variabilidad interindividual de los parámetros cinéticos y la variabilidad residual de las concentraciones in situ de salbutamol se caracterizó mediante un modelo de varianza exponencial.

Resultados y Discusión

La evolución temporal de los datos experimentales se puede justificar con un modelo cinético de incorporación pasiva junto con un proceso de secreción activa.

En la tabla 1 se muestran los resultados de los diferentes parámetros con el modelo final.

PARÁMETRO	ESTIMACIÓN	E.S. (CV %)
ka (h ⁻¹)	1.80	15.80
Vms (mM·h ⁻¹)	108.60	54.60
Kms (mM)	86.71	29.19
Kml (mM)	17.10	41.60
k ₀ (mM·h ⁻¹)	16.20	89.10
IC ₅₀	37.70	34.50
PKm	1.16	4.60
F1	0.79	0.70
SD _(ϕ ka)	0.02	173.90
SD _(ϕ F1)	0.32	16.40
SD _(ϕ VMs)	0.06	
CORR _(ka-VMs)	-1	

Tabla 1. Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el ajustado del modelo. Se muestran la media y la desviación estándar de los parámetros farmacocinéticos poblacionales junto con su coeficiente de variación.

A continuación se muestran los gráficos más representativos de la bondad del ajustado del modelo a los datos experimentales.

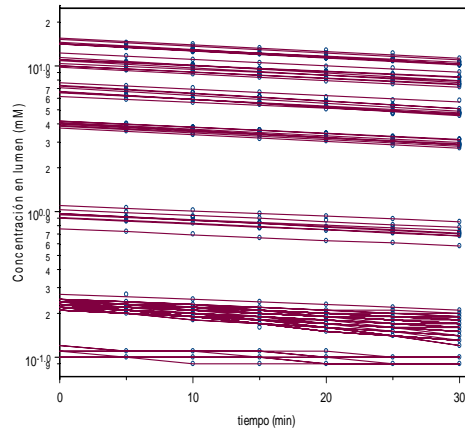


Figura 1. Representación de las concentraciones en lumen (mM) frente a los tiempos de muestreo (minutos). Los círculos representan las concentraciones experimentales y las líneas la pendiente de la curva teórica predefinida por las concentraciones en lumen predichas para cada una de las ratas.

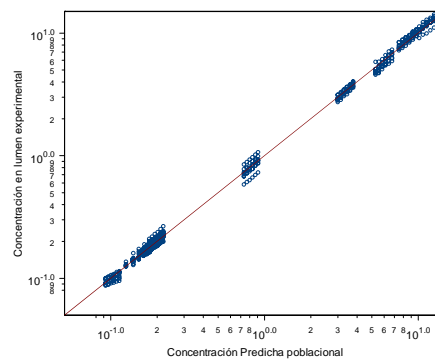


Figura 2. Representación gráfica de los puntos experimentales de las concentraciones en lumen (mM) frente a la concentración predicha poblacional y su ajuste a la línea identidad

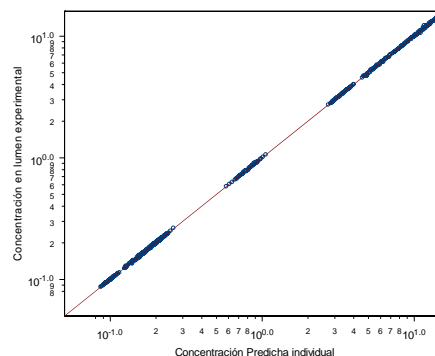


Figura 3. Representación gráfica de los puntos experimentales de las concentraciones en lumen (mM) frente a la concentración individual predicha y su ajuste a la línea identidad.

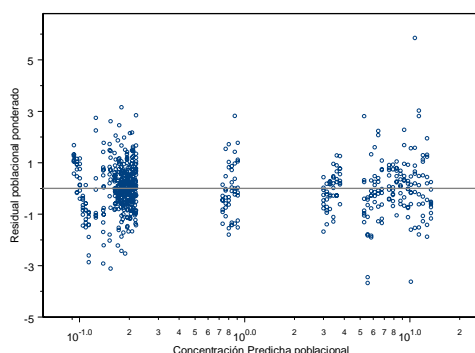


Figura 4. Representación gráfica de residuales ponderados frente a las concentraciones poblacionales predichas (mM).

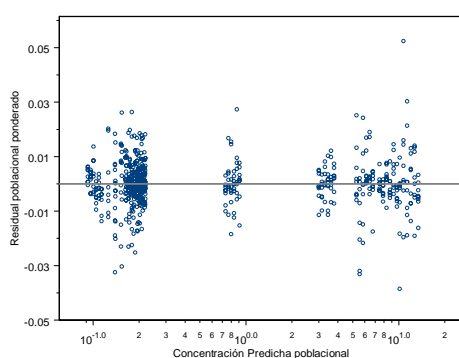


Figura 5. Representación gráfica de residuales individuales ponderados frente a las concentraciones poblacionales predichas (mM).

Los resultados obtenidos indican que el proceso de incorporación del salbutamol al organismo se puede desglosar en un proceso pasivo de entrada junto con un proceso de secreción activa desde las células absorbentes hacia el lumen intestinal. El proceso de secreción se caracteriza por su baja afinidad ($K_{ms}=86.71$ mM) y moderada capacidad ($V_{ms}=108.60$ mM·h⁻¹). Puesto que la concentración de salbutamol más elevada que se ha profundado (18 mM) no ha alcanzado el valor de la K_{ms} , se puede afirmar que, en el ámbito de concentraciones ensayadas, la secreción intestinal del salbutamol funciona plenamente.

El buen ajustado de los datos experimentales confirman que el verapamilo tiene mayor afinidad que el salbutamol por el portador ($K_{mI} = 17.10$ mM frente a $K_{ms} = 86.71$ mM). El modelo cinético seleccionado también resulta adecuado para describir la acción de la azida sódica sobre el complejo secretor. No obstante, la depleción de ATP no llega a ser suficiente para reducir de forma importante el valor de la V_{ms} y, con ello, el valor de la constante de absorción aparente. Probablemente, si el ensayo pudiera prolongarse más allá de 30 minutos, la depleción de ATP sería tal que permitiría conseguir tal efecto. En presencia de zumo de pomelo, se ha cuantificado un factor que consigue modificar el valor K_{ms} , aumentándolo 1.16 veces. Ante este resultado sólo se puede afirmar que, en nuestras condiciones experimentales, el zumo actúa como un inhibidor competitivo moderado del sistema secretor.

Bibliografía

1. Valenzuela B., Nácher A., Casabó-Alós VG, Martín-Villodre A. The influence of active secretion processes on intestinal absorption of salbutamol in the rat. Eur J Pharm Biopharm. 52(1): 31, (2001).
2. Doluisio JT, Billups NF, Ditte LW, Sugita ET, Swintosky JV, Drugs absorption I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates, J. Pharm. Sci., 58, 1196, (1969).
3. Beal SL, Sheiner LB. NONMEM User's Guides. NONMEM Project Group, University of California, San Francisco, (1992).

Autor de contacto:

Nombre y apellidos: Belén Valenzuela Jiménez.
 e-mail: bvalenzuela@umh.es
 Institución: Universidad Miguel Hernández
 Dirección: Crta. Alicante-Valencia km. 87 03550
 Ciudad: Alicante
 Telf.: 965 91 94 14
 Fax: 965 91 95 28