

Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos (ADBE) en las Ciencias Farmacéuticas

Vicente Jesús Hernández Abad
Elizabeth Guadalupe Sánchez González
Cynthia Espinosa Contreras



Proyecto PAPIME PE 208718.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos (ADBE) en las Ciencias Farmacéuticas

Vicente Jesús Hernández Abad
Elizabeth Guadalupe Sánchez González
Cynthia Espinosa Contreras



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Datos para catalogación bibliográfica

Autores:

Vicente Jesús Hernández Abad.

Elizabeth Guadalupe Sánchez González.

Cynthia Espinosa Contreras.

Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos (ADBE) en las Ciencias Farmacéuticas.

UNAM, FES Zaragoza, febrero 2020.

Primera edición.

111 páginas.

ISBN: ???????.

Proyecto PAPIME: Mejora de la enseñanza y el aprendizaje de los procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores con clave PE208718.

Aprobado por el Comité Editorial de la FES Zaragoza en diciembre de 2019.

DERECHOS RESERVADOS

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del texto o las ilustraciones de la presente obra bajo cualesquiera formas, electrónicas o mecánicas, incluyendo fotocopiado, almacenamiento en algún sistema de recuperación de información, dispositivo de memoria digital o grabado sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos (ADBE) en las Ciencias Farmacéuticas.

D.R. © Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad # 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México,
C.U., Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Av. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente, Alcaldía Iztapalapa, C.P.
09230, Ciudad de México, México.

Introducción

La obra que aquí se presenta, denominada "Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución y Absorción de Fármacos (ADBE)" es el resultado del conocimiento de los retos a los que nos hemos enfrentado, durante más de veinte años, los autores de este libro, para tratar de transmitir este conocimiento a los alumnos del último semestre de la Carrera de QFB de la FES Zaragoza. Dichos retos pueden resumirse en los siguientes:

- 1) Carencia de un texto que compile información novedosa y completa acerca de los conceptos, mecanismos, interpretación y forma de medir los diferentes procesos.
- 2) Dispersión de la información en diversas fuentes, que incluyen en su mayoría artículos científicos sobre temas específicos los procesos ADBE.

Gracias al libro que hoy se presenta, se subsanarán estas deficiencias y, estamos seguros, se logrará un conocimiento más sencillo y un dominio de los conceptos aquí vertidos.

Nuestro total agradecimiento a la Dirección General De Asuntos del Personal Académico de la UNAM, que a través del financiamiento al Proyecto PAPIIME PE208718 denominado "Mejora de la enseñanza y el aprendizaje de los procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores", permitió la generación de este nuevo material educativo.



Contenido

Introducción	3
Capítulo 1. Absorción	7
1.1. ¿Qué es la absorción de fármacos?	8
1.2 ¿Por qué es necesario estudiar la absorción de fármacos?.....	8
1.3 ¿Qué factores afectan la absorción de los fármacos?.....	11
1.3.1 Factores relacionados con las propiedades del fármaco	11
1.3.1.1 Solubilidad en agua.....	12
1.3.1.2 Lipofilicidad	13
1.3.1.3 Permeabilidad del fármaco	14
1.3.2 Factores relacionados con la morfología y fisiología del sitio de absorción	17
1.3.2.1 Morfofisiología de la región de absorción.....	17
1.3.2.2 Biomoléculas transportadoras	21
1.3.2.3 Edad y estado de salud del paciente.....	23
1.3.3 Factores relacionados con el alimento y su interacción con el medicamento	23
Bibliografía	24
Capítulo 2. Distribución de Fármacos	29
2.1 ¿Qué es la distribución de fármacos?	30
2.1.1. ¿Qué factores pueden afectar la distribución de fármacos?	30
2.1.2 Distribución tisular	31
2.2 Influencia de los factores fisicoquímicos en la distribución de fármacos	33



2.3 Influencia de los factores fisiológicos en la distribución de fármacos	38
2.3.1 Efecto del contenido de agua corporal, perfusión y difusión en la distribución de fármaco	40
2.3.1.1 Efecto del agua corporal	40
2.3.1.2 Efecto de la perfusión y la difusión en la distribución de fármacos	41
2.3.2 Enlace a proteínas plasmáticas	42
2.3.3 Efecto de las condiciones biomédicas: estado de enfermedad y embarazo	43
2.3.4 Función de los transportadores de fármacos en la distribución de fármacos	45
2.3.5 Distribución de fármacos en función de los transportadores de eflujo	46
2.4 Métodos para la determinación de la distribución de fármacos	48
2.4.1 Métodos in vitro para la determinación de unión a proteínas	48
2.4.2 Estudios in vivo de unión de proteínas en animales preclínicos y humanos	49
2.4.2.1 Uso de fármacos radiomarcados	49
2.4.2.2 Aplicación de herramientas traslacionales avanzadas para determinar la distribución de fármacos en humanos	50
2.5 Referencias	51
Capítulo 3. Biotransformación de Fármacos	55
3.1 ¿Qué es la biotransformación?	56
3.2 ¿Por qué es importante estudiar la biotransformación de los fármacos?	57
3.3 ¿Qué factores afectan la biotransformación de fármacos?	60
3.3.1 Biotransformación de Fase I	60



3.3.2 Biotransformación de Fase II	63
3.3.3 Biotransformación de Fase III	67
3.3.4 Efecto de los factores fisiológicos en la biotransformación de fármacos	68
3.4 Métodos para la determinación de la biotransformación de fármacos	72
3.4.1 Modelos in vitro de biotransformación de fármacos.....	73
3.4.2 Modelos in vivo de biotransformación de fármacos	75
3.5 Referencias	77
Capítulo 4. Excreción de Fármacos	87
4.1 ¿Qué es la excreción de fármacos?	88
4.2 ¿Por qué es necesario estudiar la excreción de los fármacos?.....	88
4.3 ¿Qué factores afectan la excreción de fármacos?	91
4.3.1 Excreción biliar	91
4.3.2 Excreción renal	94
4.4 Métodos para la determinación de la excreción de fármacos.....	99
4.4.1 Métodos in vitro en la determinación de la depuración biliar	99
4.4.2 Métodos in vitro en la determinación de la depuración renal	100
4.4.3 Métodos in vivo en la determinación de depuración biliar y renal ..	101
4.5 Referencias	104
Abreviaturas	109



Capítulo 1

Absorción de fármacos

1.1. ¿Qué es la absorción de fármacos?

La absorción es el proceso mediante el cual el fármaco alcanza la circulación sistémica después de su administración extravascular. Con base en lo anteriormente mencionado, es de esperar entonces que el fármaco solamente esté presente en la sangre si después de su administración por vía oral, intramuscular, subcutánea o cualquier otra que sea diferente a la administración directa al sistema vascular ha sufrido un proceso de absorción¹⁻².

1.2 ¿Por qué es necesario estudiar la absorción de fármacos?

Un concepto fundamental en la farmacología es aquel que relaciona la intensidad del efecto con la concentración de fármaco en el sitio de acción. A saber, a mayor concentración del fármaco en el sitio de acción, mayor intensidad del efecto. Ahora bien, es fácil establecer que la concentración del fármaco en el sitio de acción, está relacionada de manera directa con la concentración del fármaco en sangre (es decir, en la circulación general) y, dado que la concentración del fármaco en la sangre es resultado directo de la cantidad de fármaco en este fluido, es fácil intuir que la cantidad de fármaco que llega a la sangre es el resultado, entre otros factores, de la cantidad de fármaco absorbido si la administración de éste se llevó a cabo por una vía diferente a la intravascular (Figura 1.1)³⁻⁴.





Figura 1.1 Representación de la llegada del fármaco al sitio de acción.

En este momento, es pertinente introducir el concepto de biodisponibilidad absoluta (F), comúnmente utilizado en Biofarmacia, y que expresa la capacidad de un fármaco determinado, tras su administración extravascular, para alcanzar la circulación sistémica. Este parámetro relaciona la proporción de la dosis administrada por vía extravascular que ha aparecido en la circulación general con la cantidad de fármaco que es administrada y cuantificada directamente en la circulación general (dosis IV). La biodisponibilidad puede ser expresada de manera cuantitativa mediante la Ecuación 1.1.



$$F = \frac{ABC_{po} D_{iv}}{ABC_{iv} D_{po}}$$
Ecuación 1.1

Donde:

ABC_{po} = Área bajo la Curva Concentración plasmática vs tiempo, administración oral.

ABC_{iv} = Área bajo la Curva Concentración plasmática vs tiempo, administración intravenosa.

D_{po} = Dosis administrada por vía oral.

D_{iv} = Dosis administrada por vía intravenosa.

La biodisponibilidad es la expresión cuantitativa de la forma en que el fármaco sobrepasó las barreras biológicas para su absorción (como podría ser la barrera intestinal, para la absorción en este órgano) y los efectos de primer paso tanto en el sitio de absorción (por ejemplo, su biotransformación por la microbiota intestinal) como en órganos biotransformadores determinados (el hígado, por ejemplo, tras la administración oral). Derivado de lo anterior, es fácil entender que el fármaco está biodisponible cuando ha sobrepasado las barreras que le impiden alcanzar la circulación sistémica. En este sentido, un fármaco con una biodisponibilidad de 100% ($F=1$) es aquel para el que se ha determinado una cantidad en sangre igual a la obtenida tras su administración intravenosa (guardando las proporciones de las dosis, las cuales podrían ser diferentes, entre otros factores, en función de la solubilidad del compuesto), lo que indicaría que toda la dosis administrada por vía extravascular ha sido resistente a la biotransformación de primer paso y ha sobrepasado las barreras biológicas que pudieran impedir su ingreso a la circulación general. Por otra parte, un fármaco con una biodisponibilidad del 50% (es decir, $F=0.5$), es aquel en el que se ha perdido el 50% de la dosis originalmente administrada por la vía extravascular. Como resultado de la breve explicación anterior, puede observarse que la biodisponibilidad absoluta del fármaco será el resultado de la fracción de dosis que ha atravesado las barreras biológicas y de la proporción de fármaco remanente tras los diferentes procesos de biotransformación que pudiera sufrir durante su paso del sitio de absorción a la circulación general, lo que puede ser explicado con el modelo matemático expresado en la Ecuación 1.2⁴.



$$F = (f_a) (F_G * F_H * F_P)$$

Ecuación 1.2

Donde:

F = Biodisponibilidad absoluta.

f_a = Fracción de la dosis que ha atravesado las barreras biológicas.

F_G, F_H, F_P = Biodisponibilidades "locales" (gastrointestinal, hepática, pulmonar).

Resulta claro, a partir de la Ecuación 1.2, que el valor numérico que toma la fracción de la dosis absorbida afecta de manera directa la magnitud de la biodisponibilidad absoluta y, por ende, la cantidad de fármaco en el sitio de acción. Por lo anterior, el estudio de los factores que afectan la absorción de fármacos a partir del sitio de administración del medicamento es fundamental para explicar la magnitud y, en muchas ocasiones, la naturaleza del efecto obtenido.

1.3 ¿Qué factores afectan la absorción de los fármacos?

De manera general, la absorción sistémica de un fármaco depende primordialmente de las propiedades del fármaco, de la naturaleza del medicamento administrado, y de la anatomía y fisiología del sitio de absorción. Necesariamente, estos factores se interrelacionan al momento de analizar la absorción, teniendo en consideración la forma farmacéutica en que se ha dosificado el fármaco, el sitio de administración del medicamento y el sujeto que lo recibe.

1.3.1 Factores relacionados con las propiedades del fármaco

Las comúnmente denominadas propiedades "físicoquímicas" del fármaco, tales como solubilidad en agua, velocidad de disolución, lipofiliidad y peso molecular son determinantes para su absorción, partiendo del principio de que el fármaco debe estar disuelto para que pueda permear y, por ende, ser absorbido a través de las barreras biológicas pero, por otra parte, las propiedades físicoquímicas modifican la capacidad del fármaco de atravesar las barreras biológicas ya que afectan su permeabilidad. Este principio ha sido establecido desde hace más de dos décadas, a partir de la publicación del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de fármacos planteado por Amidon^{4,5}.



1.3.1.1 Solubilidad en agua

Como se ha mencionado anteriormente, la solubilidad del fármaco es un factor crítico para la absorción de este, toda vez que para que la molécula pueda permear a través de las barreras biológicas debe estar disuelta en agua^{3, 4}. De manera general, la solubilidad del fármaco en agua es función de las propiedades de la molécula, del sólido y del ambiente en que se disuelve.

Con relación a las propiedades de la molécula, factores tales como su peso molecular, su capacidad de ionización, su polaridad, su capacidad de formar puentes de hidrógeno, entre otras, modifican sustancialmente su solubilidad en agua. Las sustancias neutras y con pesos moleculares elevados parecen tener, de manera general, una solubilidad menor en agua, siempre y cuando los valores de $c\text{Log } P^a$ de las mismas sean mayores a un valor de 3⁷.

Las propiedades del sólido influyen de manera directa en la solubilidad del fármaco. De manera general, los fármacos neutros que se presentan en sólidos cristalinos, con tamaños de partícula grandes y con calores de fusión elevados presentan bajas solubilidades en agua^{4, 8}.

Para los fármacos que son ionizables, la formación de sales de los mismos favorece su solubilidad en agua. Sin embargo, la interacción de la sustancia con el entorno modifica, necesariamente, la capacidad de disociación del compuesto y, por ende, su solubilidad, en función del pH y la presencia de alimentos o determinados compuestos en el sitio de absorción³.



1.3.1.2 Lipofilicidad

En un reciente estudio encaminado a establecer cuáles eran las propiedades fisicoquímicas que predominantemente modificaban la biodisponibilidad de 309 fármacos, se encontró que la fracción de fármaco absorbida disminuye al incrementarse el peso molecular, la polaridad, el área superficial polar (ASP)^b, el total de grupos funcionales donadores (N-H u O-H) o átomos aceptores (O, N) de puentes de hidrógeno y el número de enlaces en la molécula que no forman parte de un anillo y que cuentan con capacidad de rotar sobre sí mismos, ya que estas propiedades tienden a disminuir la capacidad de las moléculas para atravesar las membranas lipídicas¹⁰.

Por otra parte, y de una manera empírica, Lipinski estableció, mediante la conocida "regla de los 5", que en caso de que un fármaco cuente con dos o más de los atributos mencionados en la Tabla 1.1, este presentará una fracción absorbida pequeña¹¹. Sin embargo, debe tenerse en consideración que, si bien la lipofilicidad de la molécula es una característica deseable para favorecer un incremento en la fracción del fármaco absorbida (fa), esta lipofilicidad elevada también se relaciona con una capacidad mayor del fármaco de ser metabolizado, con lo que un resultado posible y paradójico sería que la biodisponibilidad absoluta del compuesto disminuyera aún con propiedades del mismo que favorecieran su capacidad para atravesar las barreras biológicas⁴.

Tabla 1.1 Atributos empíricos de la regla de los 5 de Lipinski⁸.

- Más de 5 grupos con capacidad de "donar" puentes de hidrógeno.
- 10 átomos "aceptores" de puentes de hidrógeno.
- Peso molecular mayor a 500 g/mol.
- Log P > 5.

- a Es el valor de Log P calculado a partir de la contribución de los diferentes grupos funcionales que modifican la lipofilicidad de la molécula⁶.
- b Se define como el área superficial de la molécula ocupada por átomos de hidrógeno y oxígeno y los átomos de hidrógeno polares unidos a ellos. Este parámetro refleja de una manera importante la polaridad de la molécula y su capacidad para formar puentes de hidrógeno⁷.



1.3.1.3 Permeabilidad del fármaco

La absorción del fármaco tras su administración por vía oral conlleva su disolución en los fluidos del tracto gastrointestinal, seguida por el transporte del soluto de la luz intestinal hacia la circulación general a través, principalmente, de los diferentes segmentos del intestino. Este proceso requiere que el fármaco atraviese las membranas biológicas intestinales utilizando mecanismos diversos, que involucran ya sea la difusión pasiva o facilitada, el transporte transcelular o paracelular, el transporte activo o, inclusive, la endocitosis (Figura 1.2)³.

La mayoría de los fármacos neutros lipofílicos siguen los mecanismos de transporte transcelular por difusión pasiva para ingresar a la célula. Los compuestos hidrofílicos, aquellos cuyas moléculas presentan cargas efectivas en el microambiente del sitio de absorción^c, o ambos, cruzan la barrera epitelial intestinal por difusión paracelular a través de las uniones estrechas entre células del epitelio, siempre y cuando los radios moleculares de estas sustancias no excedan de 15 Å, toda vez que las dimensiones de las uniones estrechas se encuentran en el intervalo de 10 a 50 Å¹³. Por lo anterior, el transporte paracelular es de poca relevancia cuantitativa en la absorción de fármacos. Para los fármacos hidrofílicos, las rutas de absorción que están relacionadas con el influjo o eflujo a través de transportadores son sumamente importantes, y permiten explicar en mayor medida su absorción^{3, 11}.

c Es importante considerar aquí que la presencia de cargas efectivas en las moléculas del fármaco es función directa del pKa del compuesto y del pH en el sitio anatómico.



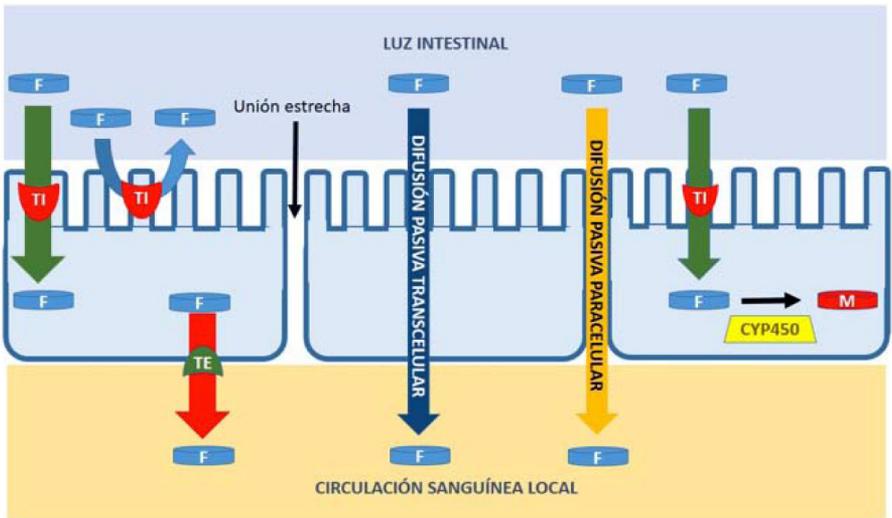


Figura 1.2 Posibles mecanismos de transporte del fármaco (F) a través de las monocapas epiteliales intestinales. Se representa el transporte por injunción (TI), transporte por eflujo (TE), el transporte por difusión pasiva transcelular, por difusión pasiva paracelular. Así mismo, se señala la posibilidad de generación de productos de la biotransformación del fármaco (M) dentro del epitelio por acción de enzimas intracelulares, como los citocromos.

El transporte por difusión pasiva no requiere del gasto de energía, pero es función del gradiente de concentración de fármaco que se presenta en la vecindad del sitio de absorción, de acuerdo con la primera ley de Fick (Ecuación 1.3)¹².

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DAK}{h} (C_{GI} - C_p) \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde:

$$\frac{dQ}{dt} = \text{Velocidad de difusión.}$$

D = Coeficiente de difusión.

A = Área superficial de la membrana.

K = Coeficiente de reparto lípidos-agua en la membrana biológica.

h = grosor de la membrana biológica.

C_{GI} = Concentración del fármaco en el tracto gastrointestinal.

C_p = Concentración plasmática del fármaco.

Del análisis de la Ecuación 1.3 se desprende que el coeficiente de reparto lípidos-agua afecta de manera directamente proporcional a la velocidad de difusión, lo que se traduce en una velocidad de absorción mayor entre más lipofílico sea el compuesto. Así mismo, el término ($C_{GI} - C_p$) implica que, dado que la concentración plasmática siempre será muy baja con relación a la concentración en el sitio de absorción (toda vez que el fármaco se distribuye de manera inmediata a los tejidos), la concentración de la solución de fármaco en la luz del epitelio intestinal es en realidad un factor determinante en la velocidad con que este se absorbe.



Finalmente, con relación al transporte de macromoléculas, es de entender que se requiera de procesos complejos que involucren el gasto de energía y la fusión de vesículas con una elevada actividad enzimática. Este proceso, conocido como endocitosis, es el que aprovechan moléculas tales como la vitamina B12, la leptina, entre otros¹⁴. Dada su complejidad y la limitación en tamaño y características de las moléculas que requieren de la endocitosis para ser absorbidas, su estudio se limita a un grupo muy reducido de compuestos.

1.3.2 Factores relacionados con la morfología y fisiología del sitio de absorción

Las características anatómicas de los tejidos que atraviesa el fármaco, así como la función de los mismos, tanto en el individuo sano como en el enfermo, juegan un papel preponderante en el proceso mediante el cual la sustancia activa pasa del sitio de absorción al torrente circulatorio. En esta sección, se expondrán los parámetros que a nivel celular y tisular afectan al proceso de absorción.

1.3.2.1 Morfofisiología de la región de absorción

A manera de ejemplo, se considerará la absorción de un fármaco tras su administración por vía oral para explicar el efecto que tiene el pH de la región en la que se lleva a cabo la absorción del fármaco. Las funciones del canal alimenticio (tracto gastrointestinal, Figura 1.3) son la digestión de los alimentos, la absorción de nutrientes y la propulsión de materiales a través del mismo. El canal alimenticio es, esencialmente, un tubo abierto, recubierto de una barrera mucosa, que se extiende desde la boca hasta el ano. La luz de dicho tubo es considerada un ambiente externo al organismo, y la pared mucosa separa el exterior del interior del organismo. La mucosa del tracto gastrointestinal está compuesta de tejido epitelial, el cual descansa sobre una fina capa de tejido conectivo, en la que se localizan los capilares sanguíneos y linfáticos. Para que el fármaco ingrese al organismo se requiere que atraviese este epitelio y llegue a la circulación sistémica¹⁵. En la Tabla 1.2 se mencionan las características de extensión y pH de diferentes regiones del tracto gastrointestinal las cuales se clasifican de acuerdo con la función que realiza cada una de ellas¹⁶.



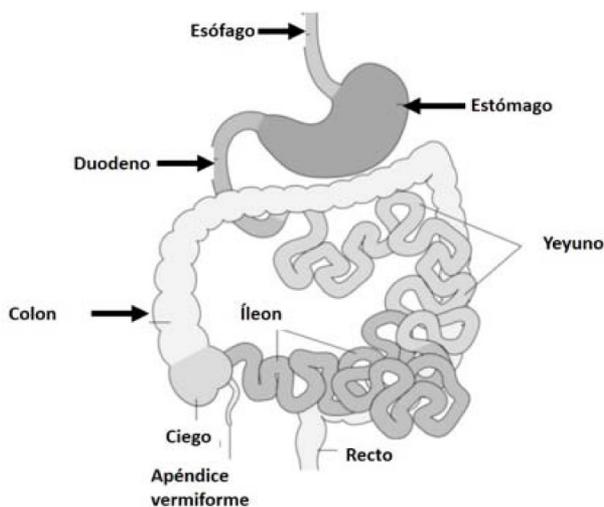


Figura 1.3 Esquema de las diferentes regiones que componen el tracto gastrointestinal (adaptado)¹⁵.

El inicio del tracto gastrointestinal se encuentra en la boca, que es donde comienza el proceso digestivo. Después de la administración por vía oral del medicamento, una porción muy reducida del fármaco entra en contacto con la mucosa bucal, donde podría absorberse, aunque en una proporción despreciable. Posterior a la región bucal se encuentran la faringe y el esófago, que son estructuras musculares que sirven como conductos para la transferencia del material ingerido desde la boca hasta el estómago¹⁵. La boca, la faringe y el esófago comparten como característica principal el hecho de que su mucosa exhibe un epitelio estratificado (seis a siete capas de tejido) y el tejido conectivo sobre el que descansa este epitelio cuenta con muy escasa vasculatura lo que, aunado al corto tiempo de tránsito, hace que en esta región la absorción de fármacos sea casi nula⁴.



A través del esófago el fármaco alcanza el estómago. La función digestiva del estómago radica principalmente en el mezclado del alimento con enzimas digestivas para formar el quimo, que es desalojado al intestino delgado a través de la válvula pilórica. La mucosa estomacal se diferencia de la esofágica en que está conformada por una monocapa epitelial columnar soportada en una capa de tejido conectivo con mayor densidad de capilares; algunas regiones del epitelio estomacal exhiben microvellosidades cuya función es secretora primordialmente. A pesar de lo anterior, y teniendo en consideración las características morfofisiológicas de este sitio (área superficial $< 0.1 \text{ m}^2$, volumen de perfusión sanguínea de 150 mL/min y tiempo de tránsito $0.5\text{-}1 \text{ h}$ máximo), la absorción estomacal sería es muy poco favorable, y se presenta solamente para compuestos no ionizados y lipofílicos con tamaño molecular pequeño. Por lo anterior, debería tenerse en consideración el coeficiente de distribución del fármaco como aspecto fundamental para predecir su absorción estomacal (la cual, de manera general, siempre será reducida)^{1, 4}.

Tabla 1.2 Características de diferentes regiones del tracto gastrointestinal⁴.

Región	Longitud (cm)	pH
Estómago	25	1.5-5.0
Duodeno	25	5.0-7.0
Yeyuno	260	6.0-7.0
Íleon	395	7.0-7.4
Ciego	7	5.7-5.9
Colon	93	5.5-7.5
Recto	55	6.5-7.0



La función del intestino delgado es la digestión de nutrientes, agua y electrolitos. Se divide en tres segmentos: duodeno, yeyuno e íleon, siendo en el primero y la región proximal del yeyuno donde se lleva a cabo la absorción de manera primordial, debido principalmente tanto a las características anatómicas del tejido que lo compone como a la presencia de transportadores que se discutirá posteriormente. El epitelio intestinal se presenta en una monocapa de enterocitos que descansan en una capa conectiva muy vascularizada. Los enterocitos se enlazan entre sí a través de las uniones estrechas. La región apical de este epitelio posee numerosas microvellosidades (3000 a 7000 en el intestino delgado, muchas menos en el grueso), que sirven para incrementar la superficie de absorción. La presencia de las microvellosidades genera una apariencia de "borde de cepillo". Aunado a lo anterior, la mucosa intestinal presenta diversas fenestraciones en el endotelio capilar, y múltiples poros en las membranas de los enterocitos, que favorecen la absorción. Por debajo de la capa basal se encuentra una capa fina de músculo liso, que permite los movimientos intestinales. Para el caso del intestino delgado, su pH se incrementa conforme se transita por sus diferentes regiones. Con base en lo anterior, es de esperar que la absorción de fármacos en este órgano sea, por mucho, superior a la estomacal, en función también de sus características morfofisiológicas (área superficial de 200 m², volumen de perfusión sanguínea de 1L/min y tiempo de tránsito de 2-4 h). Adicionalmente, en el segundo segmento del duodeno se secreta bilis, cuyas propiedades emulsificantes facilitan la solubilización y degradación de sustancias. Así mismo, la presencia de aminoácidos y péptidos en el duodeno activa la secreción de enzimas pancreáticas (amilasas, lipasas y proteasas), conjuntamente con bicarbonato. Las enzimas presentes y el cambio de pH modifican el entorno de absorción en medida suficiente para afectar la absorción de fármacos^{4, 16, 17}.

En el intestino grueso se puede llevar a cabo la absorción de agua y electrolitos, principalmente, así como de sustancias que escaparon de la absorción en íleon, así como aquellas que son el producto de la biotransformación por parte de la microbiota intestinal. En comparación con el intestino delgado, el intestino grueso presenta un área superficial muy modesta (0.35 m²), por lo que su papel en la absorción de fármacos es reducido, a pesar del tiempo de tránsito en esta región del tracto gastrointestinal (7-20 h)^{15, 16}.



1.3.2.2 Biomoléculas transportadoras

A nivel individual, las células controlan la interacción con su ambiente mediante una estructura de protección conformada por las membranas lipídicas (como barrera principal) y los canales protéicos y transportadores. El ambiente lipídico de la membrana previene el ingreso de sustancias nocivas o el escape de la célula de compuestos esenciales. Para poder controlar el tránsito de sustancias a través de las membranas, las células hacen uso de estructuras protéicas de superficie que se pueden clasificar en dos grandes grupos de transportadores, aquellos que requieren gasto de energía y los que no. Los primeros, los transportadores pasivos, permiten el paso de solutos a través de las membranas a favor de gradientes electroquímicos. Por otra parte, los transportadores activos crean gradientes iónicos o de soluto a través de las membranas, ocupando diferentes mecanismos de acoplamiento¹⁸⁻²⁰.

Gracias al advenimiento de la investigación en biología molecular y su aplicación en el campo de la salud, se ha logrado reconocer que las biomoléculas transportadoras son determinantes en la farmacocinética, farmacodinamia y seguridad de los fármacos. Estas sustancias, comúnmente denominadas transportadores de fármacos (TF) están involucradas en los procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de las sustancias activas, ya que se presentan en diversos epitelios y exhiben distribuciones en tales tejidos que difieren de un órgano a otro de manera significativa. En este apartado, se dará cuenta de su relevancia en el proceso de absorción y, por ende, biodisponibilidad de los fármacos^{4, 18}.

El primer grupo de moléculas transportadoras al que se hará referencia es al de acarreadores de soluto (sus siglas comunes son SLC, del inglés SoLute Carrier transporters). Los SLC son el grupo más grande de TF; en 2015, se consideraba que existían 456 miembros, agrupados en 52 subfamilias¹⁸. La función de los SLC no requiere primordialmente de la hidrólisis de ATP. Son principal (aunque no exclusivamente) acarreadores de in flujo, lo que los hace estar involucrados predominantemente en el transporte de pequeñas moléculas al interior de la célula, como se ha ilustrado en la Figura 2, en favor del gradiente de concentración del fármaco. Son proteínas integrales localizadas en la superficie de la membrana celular y de las membranas organelares; en el caso de la absorción oral, se localizan en la región apical del epitelio intestinal, primordialmente a nivel duodenal, con una participación regional en la absorción de fármacos (Tabla 3).



En esta región, en particular, se expresan las familias de Transportadores de Aniones Orgánicos (OATP, del inglés Organic Anion TransPorters; gen SLCO), Transportadores de Péptidos (PepT1, subfamilia gen SLC15A1) y Transportadores de Zwitteriones/Cationes Orgánicos (OCTNs; gen SLC22)¹⁹⁻²¹. Es importante considerar que no sufren normalmente de competencia o inhibición por otras sustancias.

El segundo gran grupo de transportadores es el que requiere la hidrólisis de ATP para llevar a cabo su función. Los transportadores activos primarios dependientes de ATP incluyen los miembros de la familia de transportadores ABC (ATP-Binding Cassete, por sus siglas en inglés) y bombas iónicas (ATPasas). De especial interés en la absorción de fármacos son los transportadores ABC, los cuales unen ATP y lo hidrolizan para transportar una gran variedad de sustancias, incluyendo iones, carbohidratos, lípidos, xenobióticos, entre otras; su función es principalmente de eflujo, del citoplasma hacia el exterior de la célula o hacia el interior de los organelos celulares. Los más relevantes al momento son los ABCB1 (conocidos también como glicoproteína-P), ABCC1-6 (MRP1-6, Multi Drug Resistance Protein) y los ABCG2 (conocidos también como BCRP, Breast Cancer Resistance Protein)²²⁻²⁴. Los transportadores de eflujo, al igual que los SLC, se expresan de manera importante en la membrana de borde de cepillo de las células epiteliales intestinales (Tabla 1.3).

Los transportadores de eflujo han sido los más estudiados como consecuencia de los diversos roles que juegan en el proceso de absorción de fármacos. De manera general, los transportadores ABC juegan un rol fundamental al limitar la absorción oral de diverso fármacos y al ejercer una función protectora detoxificante, esta última en función tanto de la eliminación del fármaco por eflujo como aquella mediada por biotransformación celular, al limitar la concentración del sustrato por debajo del valor de Km para el enlace a las proteínas del Citocromo P450. Por otra parte, al ser susceptibles de competencia o inhibición por diversas sustancias, son sitios comunes de interacciones fármaco-fármaco y fármaco-alimento, así como de modificaciones en su función normal en el individuo enfermo^{4,24}.



Tabla 1.3 Distribución de TF en diferentes regiones del tracto gastrointestinal humano²³.

Transportador	Región				
	Estómago	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Colon
SLC15A1		++	+	+	
SLC22A4		±		+	
SLC22A5		±		±	
ABCB1	±	+	+	+++	++
ABCC1		±	+	+	+
ABCC2		++	++	±	
ABCC3		+++	+	++	+++
ABCC4			±		
ABCC5			+		
ABCC6			+		
ABCG2		++	++	+	±

Como puede deducirse del análisis de la información plasmada en la Tabla 1.3, el control de la cantidad de fármaco absorbida mediante TF es función también de la afinidad del fármaco por un tipo de transportador en común y de la densidad de tales transportadores en la región de absorción. Sin embargo, la predicción de la influencia de los transportadores en la cantidad total de fármaco absorbida es difícil de establecer, toda vez que este factor no está aislado de los otros que se consideran en los diferentes apartados de este capítulo.

1.3.2.3 Edad y estado de salud del paciente

Es común el considerar la función del tracto gastrointestinal refiriendo al adulto sano normal. Sin embargo, en el estudio de los procesos ADBE no es posible dejar de lado la influencia que ejerce la edad en los extremos de la vida (pacientes menores de 18 años y mayores a 65) en la fisiología, en la farmacocinética y, por ende, en la farmacoterapia. En el caso particular de la absorción a partir del tracto gastrointestinal se reconoce que aún existe una brecha en el conocimiento sumamente importante, lo que no permite arribar a conclusiones suficientes debido a la carencia de estudios de la influencia de la edad en la función digestiva. A manera de ejemplo, en la Tabla 1.4 se resumen, de manera no exhaustiva, una serie de hallazgos reportados en la literatura científica.



Tabla 1.4 Modificaciones de la función gastrointestinal relacionadas con la edad del paciente.

Factor	Hallazgo
pH	Es neutro en neonatos. Llega a un valor similar al del adulto después de los 2 años de edad ²⁵
pH	Una porción importante de la población de ancianos presenta aclorhidria o hipoclorhidria ²⁶
Sales biliares	La cantidad de sales biliares secretadas por el neonato es menor a la que presenta el adulto joven ²⁷
Sales biliares	La velocidad de síntesis de ácidos biliares por parte del hígado disminuye con el envejecimiento ²⁸
Protección del tracto gastrointestinal	Hay una disminución asociada al envejecimiento en el número de células productoras de moco ²⁹
Tiempo de vaciamiento gástrico	La velocidad de vaciamiento gástrico para los líquidos es mayor en neonatos ²⁵
Motilidad del tracto gastrointestinal	En ancianos se ve disminuida la motilidad esofágica ³⁰
Microbiota intestinal	Se considera que el intestino de un neonato es estéril. La colonización bacteriana es rápida, pero difiere de individuo a individuo, con baja proliferación de anaerobios en neonatos por la concentración elevada de oxígeno ³¹ .
Microbiota intestinal	La diversidad bacteriana en ancianos disminuye. Hay un decremento en bifidobacterias y bacteroides. La modificación que sufre la microbiota es multifactorial ³² .



1.3.3 Factores relacionados con el alimento y su interacción con el medicamento

Está bien documentado que los alimentos pueden influir en la farmacocinética de un medicamento al afectar uno o más de los factores (por ejemplo, flujo biliar, flujo sanguíneo esplácnico, pH gastrointestinal, vaciado gástrico)^{32, 33}. La quelación de un medicamento con los componentes de ciertos alimentos puede dar como resultado una disminución de la biodisponibilidad³⁵.

A nivel fisiológico, el pH gastrointestinal puede provocar una disminución de la biodisponibilidad para bases débiles. Se cree que un incremento en el flujo sanguíneo esplácnico mejora la biodisponibilidad de fármacos que experimentan un efecto significativo de primer paso³⁶.

Se ha postulado que los alimentos con un alto contenido en grasas no tendrán un efecto significativo en los medicamentos de Clase 1 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Fármacos, a pesar del hecho de que muchos medicamentos de clase 1 son sustratos transportadores, en función de la elevada permeabilidad intestinal y la alta solubilidad en el fluido intestinal que posee esta clase de moléculas. Para compuestos de clase 2, que son altamente metabolizados y por lo tanto, a menudo son sustratos dobles de enzimas y transportadores, se predice un aumento en biodisponibilidad debido en parte a la inhibición del transportador. Para compuestos de clase 3, que son mal metabolizados y poco permeables y, por lo tanto, son a menudo dependientes de transportadores de absorción, se predice una disminución en su biodisponibilidad debido en parte a la inhibición del transportador³⁷⁻³⁹.



Bibliografía

1. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications, 3rd rev. ed. Media, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 1995.
2. Schuster D, Laggner C, Langer T. Why drugs fail- a study on side effects in new chemical entities. *Curr Pharm Des* 2005;11:3545-59.
3. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A. Applied biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2005.
4. Yanni S. Translational ADMET for drug therapy. Principles, methods and pharmaceutical applications. Hoboken, NJ. John Wiley & Sons, 2015.
5. Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison J. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995;12:413-20.
6. Alvarez F, Yalkowsky S. Correlation between log P and ClogP for some steroids. *J Pharm Sci* 1997;86:1187-9.
7. Gleeson M. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J Med Chem* 2008;51:817-34.
8. Sánchez-González E, Yépez-Mulia L, Hernández-Abad V, Jung-Cook H. The influence of polymorphism on the manufacturability and in vitro dissolution of sulindac-containing hard gelatin capsules. *Pharm Dev Technol* 2015;20: 306-13.
9. Pajouhesh H, Lenz G. Medicinal chemical properties of Ssuccessful central nervous system drugs. *NeuroRx* 2005;2:541-53.
10. Varma M, Obach R, Rotter C, Miller H, Chang G, Steyn S, El-Kattan A, Troutman M. Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first pass elimination. *J Med Chem* 2010;53:1098-108.
11. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:3-26.
12. Fick A. Ueber diffusion. *Ann Chem* 1857;102:59-86.
13. Blikslager A, Moeser A, Gookin J, Jones S, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* 2007;87:545-64.
14. Russell-Jones G. The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:59-73.
15. DeSesso J, Jacobson C. Anatomical and physiological parameters



- affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* 2001;39:209-28.
16. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. *Ganong Fisiología Médica*. 23ª ed. Ciudad de México. Mc Graw Hill. 2010.
 17. Kararli T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Disposit* 1995;16:351-380.
 18. César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, Reithmeier R, Hepworth D, Hediger M, Edwards A, Superti-Furga G. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*;162:478-87.
 19. Mulkidjanian A, Galperin M, Koonin E. Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 2009;34:206-215.
 20. Hediger M, Romero M, Peng J, Rolfs A, Takanaga H, Bruford E. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2004;447:465-468.
 21. Nigam S. What do drug transporters really do? *Nature Rev Drug Discov* 2015;14:29-44.
 22. Hediger M, Cléménçon B, Burrier R, Bruford E. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol Aspects Med* 2013;34:95-107.
 23. Oostendorp R, Beijnen J, Schellens J. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treatment Rev* 35;2009:137-47.
 24. Martin C, Berridge G, Higgins C, Mistry P, Charlton P, Callaghan R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000;58:624-32.
 25. Bowles A, Keane J, Ernest T, Clapham D, Tuleu C. Specific aspects of gastro-intestinal transit in children for drug delivery design. *Int. J. Pharm* 2010;395:37-43.
 26. Russell T, Berardi R, Barnett J, Dermentzoglou L, Jarvenpaa K, Schmaltz S, Dressman J. Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharm Res* 1993;10:187-96.
 27. Bongiovanni A. Bile acid content of gallbladder of infants, children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:678-685.
 28. Bertolotti M, Abate N, Bertolotti S, Loria P, Concari M, Messora



- R, Carubbi F, Pinetti A, Carulli N. Effect of aging on cholesterol 7 alpha-hydroxylation in humans. *J Lipid Res* 1993;34:1001-7.
29. Corfield A, Wagner S, Safe A, Mountford R, Clamp J, Kamerling J, Vliegenthart J, Schauer R. Sialic acids in human gastric aspirates: detection of 9-O-lactyl- and 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acids and a decrease in total sialic acid concentration with age. *Clin Sci (Lond)* 1993;84:573-9.
 30. Grassi M, Petracchia L, Mennuni G, Fontana M, Scarno A, Sabetta S, Fraioli A. Changes, functional disorders, and diseases in the gastrointestinal tract of elderly. *Nutr Hosp* 2011;26:659-668.
 31. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt P, Stobberingh E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118:511-21.
 32. Woodmansey E. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007;102:1178-86.
 33. Harris R, Jang G, Tsunoda S. Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1071-1088.
 34. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies. Food and Drug Administration; Rockville, MD: 2002.
 35. Leyden JJ. Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride, Effect of food, milk, and iron. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:308-312.
 36. Carver PL, Fleisher D, Zhou SY, Kaul D, Kazanjian P, Li C. Meal composition effects on the oral bioavailability of indinavir in HIV-infected patients. *Pharm Res* 1999;16:718-724.
 37. Liedholm H, Melander A. Concomitant food intake can increase the bioavailability of propranolol by transient inhibition of its presystemic primary conjugation. *Clin Pharmacol Ther* 1986;40:29-36.
 38. Ratain M, Cohen E. The value meal: how to save \$1,700 per month or more on lapatinib. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3397-8.
 39. Custodio J, Wu C, Benet L. Predicting drug disposition, absorption/elimination /transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(6):717-33.



Capítulo 2

Distribución de fármacos

2.1 ¿Qué es la distribución de fármacos?

Cuando un fármaco es administrado por vía oral, es absorbido a través del epitelio intestinal y trasladado a través de la membrana basolateral (BL) a la sangre de la vena porta, como se explicó previamente. Un fármaco se transporta a los hepatocitos, donde es metabolizado, excretado a la bilis o transportado a la circulación sistémica. Así, el medicamento es distribuido a varios tejidos (por ejemplo, músculo y grasa) u órganos (por ejemplo, cerebro). Se ha descrito que la distribución del fármaco es una parte integral de la absorción (A), la distribución (D), el biotransformación (B) y la excreción (E), que abarca el destino completo de un fármaco cuando ingresa al cuerpo y ejerce su propio efecto terapéutico^{1,2}.

Una circulación completa de la sangre generalmente toma aproximadamente 1 minuto, y después de este tiempo, un fármaco comenzará a distribuirse en los tejidos. La distribución se logra a través de la circulación y está influenciada por el flujo sanguíneo regional.

2.1.1. ¿Qué factores pueden afectar la distribución de fármacos?

Los factores que pueden afectar la capacidad del fármaco para distribuirse en los tejidos incluyen su solubilidad en agua y grasa. Un fármaco que es más soluble en agua tenderá a permanecer en la sangre o en los espacios intersticiales, mientras que un fármaco soluble en grasa puede concentrarse en los tejidos grasos. Los fármacos también pueden ser limitados por su capacidad para penetrar en los tejidos dependiendo de su capacidad para cruzar barreras, como la barrera hematoencefálica (BHE) o la barrera placentaria (BP). La unión del fármaco a las proteínas plasmáticas también puede afectar su capacidad de distribución. El fármaco unido no puede distribuirse en los tejidos; solo la fracción no unida (libre) se desplaza a los tejidos y determina la eficacia del fármaco^{2,3}. La extensión de la unión a proteínas puede variar entre las poblaciones humanas según la edad, el sexo, el estado de la enfermedad, y la alteración en la unión a proteínas podría potencialmente alterar la exposición al fármaco, por lo tanto, la depuración y su seguridad.



Al igual que la absorción de fármacos, muchos factores pueden influir en la capacidad de un fármaco para distribuirse en el cuerpo, como los factores físicos, químicos y fisiológicos, incluido el papel de los transportadores de fármacos, como se explicó en el capítulo anterior, que tienen un papel importante en este proceso⁴.

2.1.2 Distribución tisular

Hay varios métodos empleados para investigar la distribución de fármacos; el más común es *in vivo*, en estudios de farmacocinética (FC) en animales y humanos. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas herramientas predictivas *in vitro* e *in silico*, ahora es común predecir la distribución de fármacos en la etapa de descubrimiento de fármacos.

Para el desarrollo de fármacos, se llevan a cabo estudios preclínicos con sustancias activas radiomarcadas en modelos animales para determinar la absorción, distribución, biotransformación y excreción (ADBE) y la toxicidad potencial antes de la investigación clínica de Fase 1 en el hombre. En esta investigación preclínica, se recomienda la medición cuantitativa de la distribución del fármaco y generalmente se realiza para cada nuevo candidato a fármaco utilizando una técnica denominada "autorradiografía cuantitativa de todo el cuerpo" (QWBA por sus siglas en inglés)^{4,5}. Además, se requiere un estudio de balance de masa tradicional (EBM) para investigar la distribución cuantitativa de los fármacos en ADBE o modelos animales de toxicidad antes de que se inicien los estudios clínicos en humanos⁶. Con los nuevos avances de la inclusión de imágenes como una de las herramientas para asegurar la comprensión completa de la eficacia y seguridad de los fármacos; el uso de la tomografía por emisión de positrones (EPT) se vuelve común en las investigaciones en humanos después de tratar a sujetos con fármacos radiomarcados para monitorear la distribución de fármacos en diversos órganos del cuerpo como el cerebro (Figura 2.1)⁵.



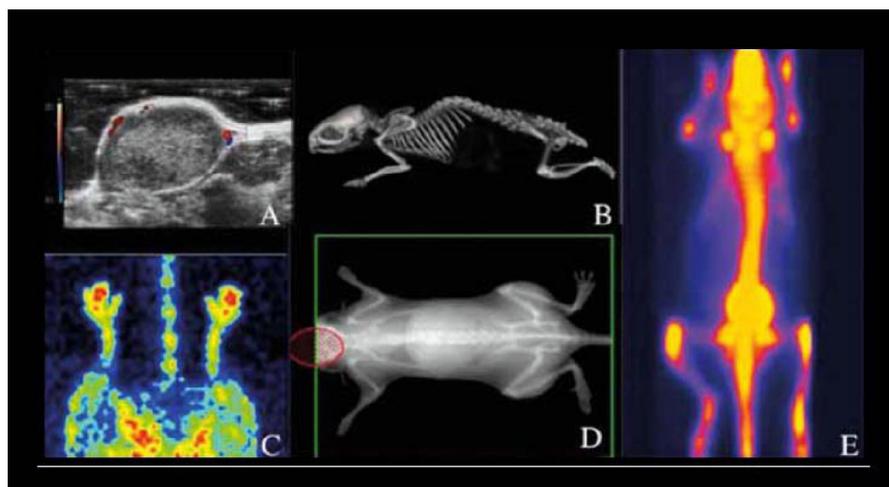


Figura 2.1 A) Imagen Doppler de un tumor sin vascularización.

B) Microtomografía de un ratón, con reconstrucción de su esqueleto. C) Doppler LASER de la extremidad posterior de un ratón. D) Absorciometría de Rayos X dual del cuerpo total de un animal. E) SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography, Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Sencillo) con ^{99m}Tc en un ratón normal⁵.

Como se describió anteriormente, la distribución de fármacos es un parámetro importante que juega un papel en la FC general de los fármacos. Su evaluación precisa es fundamental para comprender y explicar sus efectos y la seguridad de los mismos.

La distribución de fármacos se refiere a la transferencia reversible de un fármaco de un lugar a otro dentro del cuerpo⁷. El compuesto se distribuye a diferentes tejidos del cuerpo después de entrar en la circulación sistémica (es decir, la sangre). En la mayoría de los casos, el volumen de distribución en estado estacionario ($V_{d_{ee}}$) se utiliza para describir la distribución de un compuesto en el cuerpo. La distribución es generalmente desigual debido a las diferencias en la perfusión sanguínea, la unión a los tejidos, el pH regional y la permeabilidad de las membranas celulares. La distribución de un fármaco a un tejido específico y la velocidad de distribución son parámetros importantes para determinar la acción farmacológica del fármaco.



Los fármacos ácidos (los grupos ácidos comunes incluyen: carboxilatos, fenoles, sulfonamidas, átomos de nitrógeno heterocíclicos, hidroxamatos y, con menos frecuencia fosfatos, tetrazoles, tioles, alcoholes, amidas ácidas, anilinas ácidas, carbamatos, hidrazidas, imidas y sulfatos), están altamente unidos a las proteínas y, por lo tanto, tienen un pequeño volumen aparente de distribución (Vd). Los fármacos básicos, (Incluyen a las aminas alifáticas, guanidinas, amidinas, anilinas y amidas), son absorbidos por los tejidos y, por lo tanto, tienen un Vd aparente más grande que el Vd de los fármacos ácidos^{8,9}.

2.2 Influencia de los factores fisicoquímicos en la distribución de fármacos

Para que un fármaco se difunda y se distribuya en la circulación sistémica y en los órganos del cuerpo para ejercer el efecto, tiene que cruzar varias barreras, como la membrana celular de todos los órganos y tejidos del cuerpo. Como se discutió anteriormente, existen mecanismos bien identificados para que una molécula de fármaco atraviese las membranas celulares: (1) se difunde directamente a través de la membrana de la bicapa lipídica (mecanismo de difusión pasivo transcelular); (2) puede difundirse a través de poros acuosos formados por proteínas especiales en la membrana llamadas uniones estrechas (TJ, Tight Junctions en inglés, mecanismo de difusión pasivo paracelular); (3) puede unirse a proteínas transportadoras transcelulares (transportadores de fármacos) en la membrana (mecanismo de transporte activo); o (4) puede translocarse a través de la membrana celular por pinocitosis¹⁰.

La difusión a través de la bicapa lipídica (transcelular o paracelularmente) y el transporte a través de mecanismos mediado por portadores (transporte activo) representan los mecanismos más comunes de distribución de fármacos y, por lo tanto, de su disposición. El cuarto mecanismo de paso a través de la membrana, la pinocitosis, es comúnmente el mecanismo por el cual proteínas de gran peso molecular, como la insulina, pueden translocar la membrana celular, ya que los poros en las membranas son demasiado pequeños (0,4 nm). Con los avances recientes en tecnología, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento sobre el transporte de fármacos y los mecanismos involucrados; lo más importante por el momento, es identificar los transportadores de fármacos para xenobióticos y comprender su papel en la FD/FD y la seguridad de los fármacos¹⁰.



Ahora bien, existen factores relacionados con el fármaco que influyen en el mecanismo de difusión pasiva de las moléculas a través de la membrana lipídica, como la lipofilia, el pH, el pKa y la ionización. La solubilidad del fármaco en la bicapa lipídica de la membrana es un factor importante en su permeabilidad a través de la membrana celular, de ahí su disposición y FC. La absorción desde el intestino, la translocación a través de la barrera hematoencefálica y la velocidad de eliminación renal dependen en gran medida de la solubilidad del fármaco en el componente lipídico de la membrana celular, que está determinado por el coeficiente de reparto del fármaco entre la fase lipídica de la membrana y la fase acuosa y su coeficiente de difusión.

Casi todas las moléculas de tipo farmacológico son ácidos o bases débiles, lo que significa que contienen al menos un sitio que puede disociar o asociar reversiblemente un protón para formar un anión cargado negativamente o un ion cargado positivamente, según sea el caso. Las moléculas que disocian a los protones son ácidos, y las que asocian a los protones son las bases. El fármaco en solución siempre está en equilibrio con alguna fracción protonada y el resto desprotonado, Ecuaciones 2.1 y 2.2¹¹:



Al variar la disponibilidad de protones, es decir, la acidez del medio (pH), se puede cambiar el sentido del equilibrio. El valor pKa se define y determina mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch [Ecuación (2.3)], misma que permitirá evaluar el grado de ionización de ácidos y bases débiles a diferentes valores de pH, como se muestra a continuación:

$$\text{Ácido débil: } pH = pK_a + \log = \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$\text{Base débil: } pOH = pK_b + \log = \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde:

F_I = Fármaco Ionizado.

F_{NI} = Fármaco No Ionizado.



A partir de estas ecuaciones, se puede deducir que cuando el pH en un determinado sitio del organismo es más alto que el pKa, en esta región el compuesto tenderá a desprotonarse, y si el pH es más bajo que el pKa, el fármaco tenderá a estar protonado en su mayoría. El pH del contenido fisiológico del cuerpo puede controlar entonces la presencia de las especies ionizadas o no ionizadas. El pH determina el grado de ionización del fármaco y, a su vez, puede determinar la solubilidad del fármaco en los lípidos y su distribución en el cuerpo al modificar su capacidad de cruzar las membranas celulares, es decir, la forma ionizada no es soluble en lípidos y, por lo tanto, la permeabilidad del compuesto estará limitada en cuanto a su velocidad, a menos que esta sea facilitada por un mecanismo transportador específico. Por otro lado, la forma no ionizada será soluble en lípidos. En la Tabla 2.1, se muestran los fármacos ácidos y básicos conocidos con un amplio rango de valores de pKa.

Tabla 2.1 pK _a de algunos ácidos y bases ¹² .	
Fármacos	pK_a
Bases	
Cloroquina	10.8 (base fuerte)
Anfetamina	9.9
Efedrina	9.6
Propranolol	9.5
Clorpromazina	9.3
Eritromicina	8.8
Dopamina	8.4
Pentobarbital	8.1
Morfina	7.9
Ácidos	
Levodopa	2.3 (ácidos fuertes)
Benzocaína	2.5
Penicilina	2.7
Probenacíd	3.4
Aspirina	3.5
Citarabina	4.3
Warfarina	5.0
Amiodarona	6.6



El impacto del pH y el pKa de un fármaco en la distribución relativa del mismo en diferentes compartimentos corporales se explican a continuación para una base débil como la eritromicina (pKa 8.8) y un ácido débil como la aspirina (pKa 3.5).

Se observó una concentración elevada del fármaco de eritromicina (pKa= 8.88, Log P 3.06) en el compartimiento gástrico (pH de 2.0), seguido por la orina (pH 6.0), luego en plasma a pH 7.4 y una pequeña cantidad en orina a pH 8.0. Para explicar este fenómeno, basta reagrupar la Ecuación 2.4, como se muestra a continuación:

$$pOH - pK_b = \log \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación}$$

$$10^{pOH - pK_b} = \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación}$$

La relación que existe entre la fracción de fármaco ionizada y la no ionizada a cada pH, es la que se muestra en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2 Relación entre la fracción de fármaco ionizado y no ionizado a cada valor de pH para la eritromicina.

pH	$\frac{F_I}{F_{NI}}$
2	6309573
6	631
7.4	25
8	6

En contraste, se encontró que la aspirina (pKa=3.5, Log P 1.9) se encuentra en mayor concentración en la orina, pH 8.0, seguido del plasma (pH 7.4), y una cantidad mínima en el estómago, pH 2.0. Esto se explica siguiendo la lógica anterior, reagrupando la ecuación 2.3:



$$pH - pK_a = \log \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

$$10^{pH - pK_a} = \frac{[F_I]}{[F_{NI}]} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

La relación que existe entre la fracción de aspirina ionizada y la no ionizada a cada pH, es la que se muestra en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3 Relación entre la fracción de fármaco ionizado y no ionizado a cada valor de pH para la aspirina.

pH	$\frac{F_I}{F_{NI}}$
2	0.03
7.4	7943.28
8	31622.78

El perfil de distribución de estos dos fármacos indica que el fármaco no ionizado cruzará las membranas, mientras que el fármaco ionizado no cruzará en absoluto. Como resultado, la concentración total de fármaco en cada compartimento será diferente. El fármaco ácido quedará atrapado como un ión en el compartimento con el pH más alto, y uno básico quedará atrapado a un pH bajo.

Los ácidos y bases débiles se absorben bien desde el intestino, mientras que los ácidos y bases fuertes no. Se ha demostrado que los ácidos fuertes, con pKa de <2, y las bases fuertes, con pKa > 10, no se absorben bien en humanos y ratas. A diferencia de la distribución gastrointestinal, la excreción urinaria y la distribución cerebral están influenciadas por el pH del ambiente. Si la orina se vuelve ácida, la excreción de ácidos débiles disminuye, mientras que la excreción de bases débiles aumenta. Por el contrario, si la orina se vuelve básica, se presentan los efectos opuestos. Estratégicamente, al alterar el pH de la orina, se aumenta la eliminación de la sobredosis de aspirina (Tabla 2.3). Además de alterar el pH de la orina, la distribución de ácidos débiles desde el sistema nervioso central (SNC) hacia el plasma se puede aumentar mediante la administración de bicarbonato de sodio, agente que aumenta el pH plasmático. En sobredosis de ácidos débiles como el fenobarbital, la administración de bicarbonato de sodio aumenta el pH de la orina y el plasma, lo que aumentaría la eliminación y disminuiría la toxicidad del SNC¹³.



2.3 Influencia de los factores fisiológicos en la distribución de fármacos

La distribución de un fármaco se produce mediante el sistema circulatorio desde la sangre a otros tejidos, y eso ocurre a varias velocidades. Las diversas regiones de la circulación sistémica perfunden a través de innumerables vías de ramificación, que están dispuestas de manera efectiva, que fluyen desde el corazón a todas las áreas del cuerpo a través de las arterias, a los capilares a través de los órganos y la piel, luego regresan al corazón a través de las venas. Varios factores determinan el patrón de distribución del fármaco con el tiempo, incluida la capacidad de atravesar la membrana del tejido, la unión con la sangre y los tejidos y el reparto en grasas. La captación de fármacos por los tejidos continúa hacia el equilibrio de la forma difusible entre el tejido y la sangre que lo perfunde^{7,13}.

La primera etapa de la distribución de fármacos depende del gasto cardíaco y del flujo de sangre regional a los diversos órganos. La distribución del fármaco es rápida a los órganos altamente perfundidos, donde la tasa de flujo sanguíneo es mayor y estos órganos reciben la mayor parte del fármaco. En contraste, en tejidos no bien perfundidos, como los tejidos adiposos, la distribución es generalmente más lenta y el contenido de fármaco en estos compartimentos es notablemente más bajo. Como se comentó anteriormente, la distribución del fármaco desde la circulación sistémica a los tejidos depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como pK_a y pH, pero también depende de la solubilidad en los lípidos y el tamaño molecular en relación con los factores fisiológicos, como la unión a las proteínas plasmáticas, la velocidad del flujo sanguíneo, el gasto cardíaco, el volumen corporal y, lo que es más importante, la susceptibilidad a la difusión pasiva o al transporte activo. Las condiciones bioquímicas iónicas y celulares, así como las barreras biológicas como la BHE y la barrera placentaria pueden afectar el grado de distribución. Al igual que la absorción, la distribución puede estar limitada por la perfusión o la permeabilidad. Una limitación de la tasa de perfusión se convierte en clave cuando no hay una barrera para la distribución por la membrana tisular, como en el caso de los fármacos lipófilos pequeños que se difunden a través de las membranas del cuerpo. La perfusión se expresa como unidad de volumen de sangre por unidad de tiempo por volumen de tejido.



La Tabla 2.4 ilustra la tasa de perfusión de los tejidos, que varía de 0.025 a ~10 mL/min/mL para grasa o músculo en reposo al pulmón, respectivamente. Es importante mencionar que existe una correlación directa entre la tasa de perfusión del tejido y el tiempo requerido para distribuir un fármaco al tejido¹².

El fármaco existe en dos formas en sangre, la forma libre, que está activa y disponible para la biotransformación y la excreción, o la forma unida a proteínas y elementos formes, que suele ser farmacológicamente inactiva. Los principales compartimentos fisiológicos donde se distribuyen los fármacos, son el plasma, el líquido intersticial, el líquido intracelular, la grasa y órganos específicos como el hígado y el riñón, así como el músculo, el hueso y el SNC¹⁴.

Tabla 2.4 Flujo sanguíneo, índice de perfusión y tamaño relativo de diferentes órganos y Tejidos en humano estándar de 70 kg¹².

Órgano	% de Volumen	Flujo Sanguíneo	% de salida	Rango de Perfusión
	Corporal	mL/min	Cardiaca	mL/min/mL
Arteria	-	300	6	-
Bazo	0.3	77	1.5	0.4
Cerebro	2	700	14	0.5
Corazón	0.4	200	4	0.6
Glándula Tiroides	0.03	50	1	2.4
Grasa	20	200	4	0.03
Hígado	2.3	1350	27	0.8
Hueso	16	250	5	0.02
Músculo	43	750	15	0.025
Piel	11	300	6	0.04
Portal	1.7	1050	21	-
Pulmones	1.6	5000	100	10
Riñón	0.5	1100	22	4
Sangre	7	5000	100	-
Cuerpo Completo	100	5000	100	0.071



2.3.1 Efecto del contenido de agua corporal, perfusión y difusión en la distribución de fármaco

2.3.1.1 Efecto del agua corporal

La distribución del fármaco o el Vd puede determinarse mediante la evaluación de los componentes y el contenido del agua corporal. El Vd relaciona la cantidad de fármaco en el cuerpo con la concentración plasmática de la siguiente manera:

$$C_p = C_{p0}e^{-kt} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

donde C_{p0} es igual a la concentración plasmática inicial y es una función de la distribución del fármaco en el cuerpo, mientras que e^{-kt} es el parámetro de eliminación. Por definición, Vd es la relación entre la dosis en mg y la concentración plasmática de fármaco en mg/mL. Cuando el fármaco se une a las proteínas plasmática se limita su distribución, o se une a la proteína tisular, lo que aumenta su distribución; ambos casos pueden tener un impacto en la Vd. El agua corporal oscila entre el 60% y el 75% del peso corporal total, con un promedio de alrededor de 44 L, que se encuentran en el líquido intracelular (61%), seguido del líquido intersticial (27%) y, en menor medida, el plasma sanguíneo (7%) y células sanguíneas (5%)¹⁴.

El valor de Vd puede proporcionar información sobre el alcance de distribución entre el agua corporal y los tejidos. Además, la evaluación de la distribución del fármaco entre los compartimentos de agua corporal se puede lograr en función de su volumen, las membranas lipídicas, la unión a proteínas plasmáticas y los gradientes de pH que se encuentran. Cuando un fármaco ingresa al cuerpo ya sea por administración oral, intravenosa (iv) o tópica, se distribuye en el fluido intracelular, fluido intersticial, plasma sanguíneo o compartimentos de células sanguíneas, o se encuentra secuestrado dentro de un sitio celular. A medida que el fármaco es absorbido, pasa a través de los revestimientos celulares de los órganos absorbentes en el fluido intersticial. Los fluidos intersticiales e intracelulares están en equilibrio con el agua y los electrolitos, que entran y salen lentamente de las células en contraste con la sangre que se mueve rápidamente. Al ingresar a las células del tejido local, el fármaco puede tener dos pasos, ya sea entrando a los capilares sanguíneos del sistema de circulación sistémica o entrando al sistema linfático. Si el medicamento se administra por vía intravenosa al torrente sanguíneo, ingresa directamente en el compartimento de plasma¹⁵.



2.3.1.2 Efecto de la perfusión y la difusión en la distribución de fármacos

Además de todos los factores que determinan la distribución del fármaco, como la cantidad de las proteínas plasmáticas, la fracción libre de fármaco, la permeabilidad mediada por transportadores de fármacos y el agua corporal, la tasa de perfusión tisular o la difusión del fármaco que atraviesa las membranas de la barrera puede alterar la distribución de la fracción no unida del fármaco. En pocas palabras, la difusión es el mecanismo que rige la distribución de fármacos (pesos moleculares pequeños). Cuando se une a la albúmina, el peso molecular del complejo es tan alto (> 68, 000 kD) que limita la difusión¹⁵. La tasa de difusión se describe mediante la ecuación de la ley de difusión de Fick¹⁶:

$$\text{Velocidad de difusión} = \frac{-DKA (C_p - C_t)}{h} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

donde C_p es la concentración plasmática del fármaco, C_t es la concentración de fármaco en tejido, A es el área de superficie de la membrana, K es el coeficiente de reparto lípidos/agua, D es la constante de difusión y es inversamente proporcional al peso del fármaco, y h es el grosor de la membrana. El signo negativo denota la transferencia neta de fármaco desde el interior del lumen capilar a los tejidos y espacios extracelulares. Según esta relación, la difusión es espontánea y un proceso independiente de la temperatura. Como ha sido probado por algunos autores, el mecanismo de difusión pasiva se distingue del mecanismo mediado por transportadores midiendo la tasa de acumulación de fármacos en los tejidos *in vitro* durante un estudio de absorción a 4°C versus 37°C. La perfusión puede ser limitada para fármacos que son polares y muy solubles en lípidos; tan pronto como el fármaco entra en la circulación sanguínea, es libre de distribuirse completa e instantáneamente a través de las membranas sin barreras de difusión, pero está limitado por la velocidad del flujo sanguíneo al órgano^{17, 18}.



Cabe mencionar que cuando la perfusión es baja, se limita la distribución. En este caso, el equilibrio de la distribución puede tardar más en alcanzarse, especialmente cuando el coeficiente de reparto es alto. Un elevado coeficiente de permeabilidad da como resultado una alta concentración de fármaco en el tejido antes de que tenga lugar el equilibrio. Para un fármaco polar con una tasa de difusión de distribución limitada, la tasa de distribución en el tejido es una función del coeficiente de permeabilidad del fármaco, el gradiente de concentración, la distancia que recorre el fármaco, el área de superficie de difusión, la temperatura, y el peso molecular del fármaco, ya que las moléculas más pequeñas y ligeras se difundirán más rápido que las más grandes y pesadas. La permeabilidad capilar también puede tener un efecto profundo en la distribución del fármaco.

2.3.2 Enlace a proteínas plasmáticas

Factores adicionales pueden influir en la capacidad de distribución de un fármaco, incluida la tendencia de este a unirse a las proteínas plasmáticas. El plasma representa aproximadamente 55% del volumen total de la sangre y está compuesto de agua que contiene cantidades de trazas de sales, minerales y nutrientes; además contiene una variedad de proteínas, como la inmunoglobulina y el fibrinógeno; sin embargo, uno de sus constituyentes principales es la albúmina, la cual representa aproximadamente un 60% del total de las proteínas plasmáticas¹⁸.

Entre las proteínas séricas, la albúmina sérica humana (HSA), las globulinas (α , β , γ) y la glicoproteína ácida α -1 (AGP) desempeñan un papel importante en la unión de muchos fármacos, lo que es importante para determinar la distribución de estos en el organismo¹⁹.

La albúmina es básica y, por lo tanto, se une preferentemente a los compuestos ácidos (fármacos con carga negativa a pH fisiológico) y neutros, mientras que la AGP puede unirse a los fármacos básicos. Además de unirse a éstas, los fármacos se unen a otras proteínas plasmáticas de forma no específica, en menor medida²⁰.



2.3.3 Efecto de las condiciones biomédicas: estado de enfermedad y embarazo

La unión a proteínas puede considerarse como un factor que determina de manera inversa la cantidad de fármaco en el compartimento central (Vd), por lo que un mayor grado de unión a proteínas producirá un menor Vd. Hay condiciones médicas que alteran los niveles de proteínas en plasma y, por lo tanto, pueden afectar el grado de unión a proteínas plasmáticas (Tabla 2.5)¹⁷⁻²³. Diferentes estados de enfermedad (insuficiencia renal, inanición, daño hepático), el estrés y estados como el embarazo, pueden causar cambios conformacionales en el plasma o proteínas en tejidos que pueden interferir con la unión y reducir o aumentar los niveles de proteínas plasmáticas.

Tabla 2.5 Afecciones fisiológicas y médicas asociadas con plasma alterado albúmina y AGP.

Disminución de albúmina	Aumento de albúmina	Disminución de AGP	Incremento de AGP
Hepatitis viral aguda	Deshidratación	Edad avanzada	Infarto Agudo al Miocardio
Edad avanzada	Retinitis	Infarto	Lesiones por quemaduras
Edad temprana		Cirrosis	Cáncer
Cirrosis		Enfermedad hepática grave	Síndrome de dolor crónico
Hipertiroidismo		Embarazo	Enfermedad inflamatoria
Inanición		Síndrome nefrótico	Neumonía
Embarazo			Transplante renal
Insuficiencia renal			Cirugía
Cirugía			Lesión traumática
Estrés y trauma			



Durante el embarazo, los niveles de albúmina disminuyen, dando como resultado un aumento significativo en las fracciones no unidas para fármacos como el fenobarbital, el ácido salicílico, la dexametasona, el diazepam, el ácido valproico, la fenitoína y el propranolol^{22, 23}. La seguridad en la exposición sistémica de esas fracciones no unidas al fármaco representa un problema para el feto por el paso a través de la placenta materna después del tratamiento que recibe la madre. Para minimizar cualquier toxicidad mediada por fármaco para el feto, se puede sugerir un ajuste de dosis.

La unión a proteínas es diferente en pacientes pediátricos con relación a la observada en adultos para algunos fármacos. En la Tabla 2.6 se muestra que las proteínas plasmáticas en los infantes (0-1 año) pueden no estar presentes, o bien presentes pero a baja concentración, o un tipo de proteína diferente a las del plasma de adultos. Además, se sabe que la permeabilidad (absorción o secreción de las células de los órganos del cuerpo) a través de la membrana celular tiene un alto impacto en los cambios de la distribución del fármaco en el crecimiento de un niño. Lo anterior, aunado a un volumen de agua extracelular que no alcanza a asemejar al de un adulto hasta que el paciente pediátrico ha cumplido un año de edad, en promedio²⁴⁻²⁵.

Tabla 2.6 Cambios en la composición de proteínas plasmáticas con respecto al desarrollo infantil¹².

Componente de plasma	Grupo de edad en el desarrollo infantil		
	Neonato (<28 Días)	Infante (1 mes-1 año)	Niño (1-8 años)
Proteína Total	↓	↓	< = >
Albúmina Plasmática	↓	< = >	< = >
Globulina Plasmática	Presente	Ausente	Ausente
Albúmina Fetal	↓	↓	< = >
Glicoproteína α1	↓	Desconocido	< = >

< = > Equivalente a nivel del adulto; ↓ por debajo del nivel del adulto.



La permeabilidad de la membrana es particularmente alta en neonatos inmaduros. La mielinización, que contrarresta el paso de fármacos, continúa después del nacimiento, por lo que la penetración de productos terapéuticos en el SNC debe considerarse como un asunto crítico para los recién nacidos prematuros. Del mismo modo, la barrera hematoencefálica en recién nacidos a término no está completamente madura, y los fármacos penetran fácilmente en la membrana de las células epiteliales hasta el SNC, lo que provoca una alta exposición no deseada y, por lo tanto, toxicidad²⁴⁻²⁵.

Es importante tener en cuenta que los cambios en la fracción de fármaco no unido no siempre producen cambios proporcionales en la depuración o Vd. Los contribuyentes importantes al cambio de la concentración del fármaco también serán la extensión de la unión, el tipo de eliminación, el volumen de distribución, vía de administración y cambios concomitantes en el depuración intrínseco (celular) debido a la inducción o inhibición de las enzimas hepáticas.

En el descubrimiento de fármacos, durante los procesos de optimización y la selección de candidatos, los estudios de unión a proteínas plasmáticas desempeñan un papel importante en el proceso de selección y desarrollo de fármacos candidatos. Los procesos de evaluación tratan no solo de identificar la capacidad del fármaco para unirse a las proteínas plasmáticas, sino también de determinar la cantidad de fármaco que se une a una concentración de proteína determinada, es decir, la concentración del fármaco libre y la afinidad del fármaco por los sitios de unión de la molécula de proteína²⁶⁻²⁷.

2.3.4 Función de los transportadores de fármacos en la distribución de fármacos

Los transportadores de fármacos se expresan en todos los órganos del cuerpo, en particular en aquellos tejidos responsables de la disposición y eliminación de fármacos, como son el hígado, el riñón, inclusive en el intestino y el cerebro. Algunos estudios han informado sobre la expresión y localización de tales transportadores²⁸⁻³⁰.



La mayoría de los fármacos se distribuyen a través de las membranas celulares con la ayuda de proteínas transportadoras que se han expresado en todas las células vivas a distintos niveles y se distribuyen diferencialmente a través de los tejidos y las membranas de barrera, ya sea para apoyar la acumulación o excreción de tejidos. Debido a que la unión a los transportadores de fármacos es un proceso dependiente de la concentración (una cinética saturable), puede llevar a una FC no lineal, incluida la distribución³¹⁻³⁴.

2.3.5 Distribución de fármacos en función de los transportadores de eflujo

De los transportadores de eflujo, el más importante, la glicoproteína P (P-gp), es considerado como un contribuyente importante para el transporte de fármacos a través de membranas, en la disposición de fármacos y su papel subyacente en la resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés)³¹⁻³⁵. Para ejercer su función, la P-gp y otros transportadores de eflujo requieren la unión directa e hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP); en consecuencia, se le conoce como superfamilia de transportadores ABC, con al menos 49 miembros identificados en los seres humanos. Esos 49 transportadores están divididos en siete familias, los más investigados son ABCB1, ABCC1, ABCC2 y ABCG2. Otra familia importante de los transportadores que juegan un papel crítico en la distribución de fármacos son los transportadores de soluto (SLC). Estos transportadores incluyen los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) y transportadores de cationes orgánicos (OCTP). A diferencia de los transportadores ABC, los transportadores SLC no utilizan directamente una fuente de energía. Juntos, los transportadores ABC y SLC están cada vez más implicados en la regulación del paso de los productos químicos endógenos y exógenos a través de membranas celulares y tisulares, desempeñando así un papel fundamental en la distribución de fármacos y la posterior disposición, eficacia y toxicidad ya que todos ellos han sido implicados clínicamente en interacciones fármaco-fármaco relevantes (DDI, por sus siglas en inglés, Drug-Drug Interactions). Además de su asociación con las DDI, los transportadores de fármacos median una distribución diferencial de los fármacos a través de los compartimientos corporales dentro de una población humana como resultado de la aparición de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) dentro de las moléculas transportadoras^{31, 33, 36-40}.



La expresión y localización de ABC y transportadores SLC en las regiones apical (AP) y basolateral (BL) de las células epiteliales y endoteliales, respectivamente (excepto en el intestino, donde ABC y SLC se encuentran en el polo AP) juega un papel casi específico en los procesos de distribución de los fármacos en diferentes compartimentos del cuerpo. Los transportadores ABCB1 y ABCG2 (P-gp) están altamente expresados en la mayoría de los tejidos de barrera, como los epitelios intestinales, la barrera hematoencefálica, testículos, placenta, y células endoteliales de la vasculatura cardíaca humana, lo que explica en buena medida la función de dichos tejidos. Por otra parte, la captación mediada por transportadores de solutos se asocia a DDI, toda vez que hay competencia por la unión a tales transportadores entre diversos grupos de fármacos³⁶⁻⁴⁰.

Una idea general del paso de fármacos a través de las diferentes barreras biológicas, puede ser expresada con la Figura 2.2.

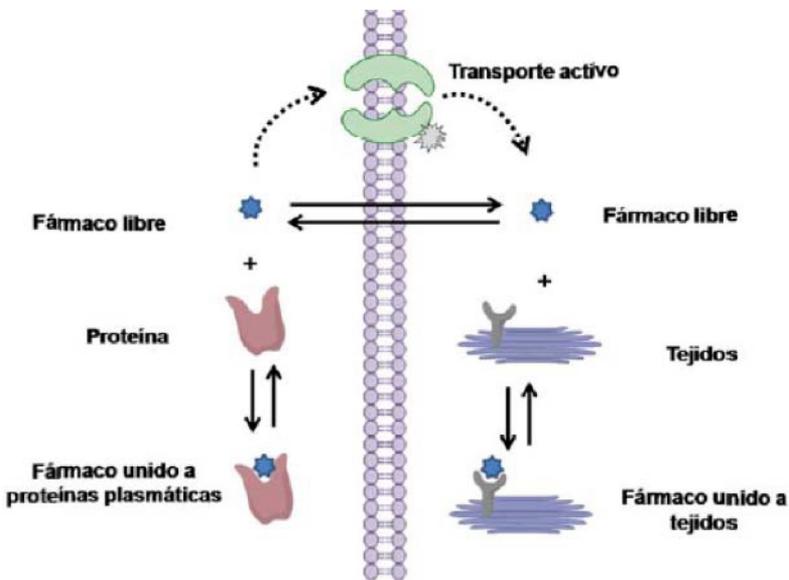


Figura 2.2 Esquema general del paso de un fármaco a través de una barrera biológica².

2.4 Métodos para la determinación de la distribución de fármacos

2.4.1 Métodos *in vitro* para la determinación de unión a proteínas

Hay varios métodos *in vitro* utilizados para medir el grado de unión del fármaco al plasma o los compartimentos celulares, incluida la diálisis de equilibrio, que es uno de los más comunes, fáciles de implementar. Otros métodos *in vitro* se usan para determinar la unión, tal como ultrafiltración, ultracentrifugación, y separación cromatográfica de proteínas (Figura 2.3)⁴¹⁻⁴³.

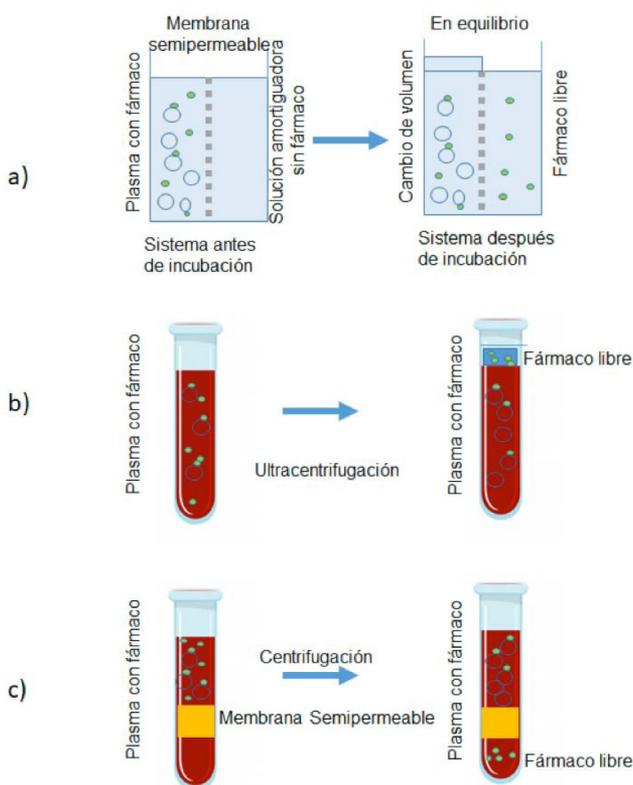


Figura 2.3 Métodos para determinar unión a proteínas plasmáticas:

a) Diálisis al equilibrio, b) ultracentrifugación y c) Membrana semipermeable (ultrafiltración).

La ecuación para calcular la fracción de fármaco no unido a proteínas es la siguiente:

$$f_u = \frac{\text{Concentración de fármaco en la solución amortiguadora}}{\text{Concentración de fármaco en plasma}} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

donde la concentración del fármaco en la solución amortiguadora es el compuesto no unido después de la diálisis, y la concentración del fármaco en plasma es el fármaco unido que permanece en el compartimento del plasma después de la diálisis⁴⁴⁻⁴⁶.

Los porcentajes de fármaco sin unir (libre) y unido a la proteína se calculan como sigue::

$$\% \text{libre} = f_u * 100 \text{ y } \% \text{unido} = (1 - f_u) * 100 \quad \text{Ecuación 2.12}$$

La recuperación del compuesto de prueba al final del estudio debería ser teóricamente del 100%, y se puede determinar a partir del porcentaje de la proporción de la concentración total del fármaco en los compartimentos de ambos solución amortiguadora y plasma después de la diálisis con la concentración total del fármaco en ambos compartimentos solución amortiguadora y plasma antes de la diálisis. Cualquier desviación del 100% puede indicar la unión del compuesto al equipo de diálisis o un problema de solubilidad del fármaco de prueba. Los estudios de unión a proteínas se llevan a cabo como parte rutinaria del proceso ADBE como se mencionó, usando un medicamento radiomarcado o no marcado usando LC-MS/MS para cuestiones de sensibilidad y selectividad.

2.4.2 Estudios *in vivo* de unión de proteínas en animales preclínicos y humanos

2.4.2.1 Uso de fármacos radiomarcados

Se han realizado estudios de distribución de fármacos en especies preclínicas aplicando técnicas tales como QWBA y MBS donde se usan fármacos radiomarcados. En el balance de masa y la distribución tisular del fármaco, ya sea en animales o en humanos, la dosis total utilizada en los estudios de radiomarcaje suele ser una dosis farmacológicamente relevante⁴⁷⁻⁴⁸.



2.4.2.2 Aplicación de herramientas traslacionales avanzadas para determinar la distribución de fármacos en humanos

Además del uso de métodos tradicionales para evaluar la distribución tisular de un compuesto de prueba en pacientes después de la administración oral o intravenosa al analizar los niveles en plasma, heces y orina del medicamento original y los metabolitos, el uso no invasivo de la PET, la resonancia magnética (IRM) y el modelado *in silico* ahora se consideran una herramienta importante para la investigación con el desarrollo de nuevos fármacos⁴⁴⁻⁴⁸.



2.5 Referencias

1. Caldwell G, Yan Z, Tang W. ADME optimization and toxicity assessment in early- and late-phase drug discovery. *Curr Top Med Chem* 2009;9(11):965-980.
2. Talevi A, Quiroga P, Ruiz M. *Procesos biofarmacéuticos*. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata. 2016.
3. Wang J. Comprehensive assessment of ADMET risks in drug discovery. *Curr Pharm Des* 2009;15(19):2195-2219.
4. Song N, Zhang S, Liu C. Overview of factors affecting oral drug absorption. *Asian J Drug Metabolism Pharmacokinetics* 2004;4(3):167-176.
5. Greco A. Preclinical image in the era of personalised Medicine. *Healthmanagement.org*. 2017; 17:162-6
6. Schanker L, Shore P, Brodie B, Hogben C. Absorption of drugs from the stomach I. The rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1957;120(4):528-539.
7. Penner N, Klunk L, Prakash C. Human radiolabeled mass balance studies: objectives, utilities and limitations. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30(4):185-203.
8. Rodgers T, Rowland M. Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharm Res* 2007;24(5):918-933.
9. Rowland M, Riegelman S. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma. *J Pharm Sci* 1967;56(6):717-720.
10. Hidalgo I. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem* 2001;1(5):385-401.
11. Oommen V, Ganesh G, Vadivel K, Kanthakumar P. The Henderson-Hasselbalch Equation : A Three Dimensional Teaching Model. *Indian J Phys Pharmacol*. 2016;60(1):70-75.
12. Yanni S. *Translational ADMET for drug therapy*. Hoboken NJ. John Wiley & Sons. 2015.
13. Benet L, Izumi T, Zhang Y, et al. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999;62(1,2):25-31.
14. Wallace G, Ramsden D, Grant M. General principles of drug distribution. In: *Encyclopedia of drug metabolism and interactions*, ed. Lyubimov AV. Hoboken, NJ: Wiley, 2012, 3:1-47.
15. Levitt D. Quantitative relationship between the octanol/water partition coefficient and the diffusion limitation of the exchange between adipose and blood. *Clin Pharmacol* 2010;10:1-13.



16. Banker M, Clark T. Plasma/serum protein binding determinations. *Curr Drug Metab* 2008;9:854-859.
17. Yanni S, Augustijns P, Benjamin D, Brouwer K, Thakker D, Annaert P. In vitro investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metab Dispos* 2010 38:1848-1856.
18. Otagiri M. Study on binding of drug to serum protein. *Yakugaku Zasshi* 2009;129(4): 413-425.
19. Tozer T. Implications of altered plasma protein binding in disease states. In: Benet Lz, editor. *Pharmacokinetic basis for drug treatment*. New York: Raven Press; 1984. pp. 173-193.
20. Piaky K. Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin Pharma- cokinetic* 1980;3:246-262.
21. Verbeek R, Cardinal JA, Wallace SM. Effect of age and sex on the plasma binding of acidic and basic drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 1984;27(1):91-97.
22. Perucca E, Crema A. Plasma protein binding of drugs in pregnancy. *Clin Pharmacokinetic* 1982;7(4):336-352.
23. Perucca E, Ruprah M, Richens A. Altered drug binding to serum proteins in pregnant women: therapeutic relevance. *J R Soc Med* 1981;6:422-426.
24. Benedetti M, Whomsley R, Baltes E. Differences in absorption, distribution, metabolism and excretion of xenobiotics between the paediatric and adult populations *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1(3):447-471.
25. Heresi G, Gerstmann D, Reed M, van den Anker J, Blumer J, Kovanda L, Keirns J, Buell D, Kearns G. The pharmacokinetics and safety of micafungin, a novel echinocandin, in premature infants. *Pediatr Infect Dis J*
26. Tesseromatis C, Alevizou A. The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetic* 2008;33(4):225-230.
27. Meijer DK, Van der Sluijs P. The influence of binding to albumin and alpha 1-acid glyco- protein on the clearance of drugs by the liver. *Pharm Weekbl Sci* 1987;9(2):65-74.
28. Daood M, Tsai C, Ahdab-Barmada M, Watchko J. ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS. *Neuropedi- atrics* 2008;39(4):211-218.
29. Giacomini K, Huang S, Tweedie D. Membrane transporters in drug develop- ment. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215-236.



30. Ho R, Kim R. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:260-277.
31. Chandra P, Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 2004;21:719-735.
32. Deoon Lee E, Lean C, Limenta L. Role of membrane transporters in the safety profile of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5(11):1369-1383.
33. Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008;13(9/10):379-393.
34. Jung N, Taubert D. Organic cation transporters and their roles in antiretroviral drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5(7):773-787.
35. Hagenbuch B, Gao B, Meier PJ. Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol Sci* 2002;17:231-234.
36. Sharom F. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 2011;50(1):161-178.
37. Fredriksson R, Nordstrom KJ, Stephansson O. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* 2008;582(27):3811-3816.
38. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:425-446.
39. Grover A, Benet LZ. Effects of drug transporters on volume of distribution. *AAPS J* 2009;11(2):250-261.
40. Nakanishi T, Tamai I. Putative roles of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cell survival and progression of human cancers. *Biopharm Drug Dispos* 2014. doi:10.1002/bdd.1915.
41. van Liempd S, Morrison D, Sysmans L, et al. Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom* 2011;16(1):56-67.
42. Banker M, Clark T, Williams J. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *J Pharm Sci* 2003;92(5):967-974.
43. Kariv I, Cao H, Oldenburg KR. Development of a high throughput equilibrium dialysis method. *J Pharm Sci* 2001;90(5):580-587.



44. Gad S. Preclinical development handbook: ADME and biopharmaceutical properties. Hoboken, NJ: Wiley, 2009, 1:1103-1132.
45. Richter W, Starke V, Whitby B. The distribution pattern of radioactivity across different tissues in quantitative whole-body autoradiography (QWBA) studies. *Eur J Pharm Sci* 2006;28(1-2):155-165.
46. Roffey S, Obach R, Gedge J. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug Metab Rev* 2007;39(1):17-43.
47. European Medicines Agency. Toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies. ICH topic S3A, CPMP/ICH/384/95. EMA, 1995.
48. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Guidance for Industry M3. Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. FDA, 2010.



Capítulo 3

Biotransformación de fármacos



3.1 ¿Qué es la biotransformación?

La presencia de fármaco en el cuerpo generalmente se cuantifica con el parámetro de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) o el de Tiempo Medio de Residencia (MRT, siglas en inglés de Mean Residence Time). El valor de $t_{1/2}$ de un fármaco, representa el tiempo necesario para eliminar la mitad de la cantidad de la sustancia presente al tiempo inicial, y con este se mide la capacidad de permanencia del fármaco en el organismo. En la gran mayoría de las ocasiones, el grado de biotransformación está directamente relacionado con el grado de eliminación del fármaco del cuerpo. Para los fármacos que son estables a la biotransformación, su proceso de eliminación puede ser mediante la excreción renal, pulmonar, biliar o por combinación de dos de estas vías o todas. La depuración hepática seguida de la depuración renal son las dos vías que se han asociado con la eliminación de la mayoría de los fármacos que se han desarrollado hasta la fecha. La depuración hepática puede ocurrir predominantemente por biotransformación o por excreción biliar, o ambos.

La biotransformación es un proceso mediante el cual el organismo modifica la estructura química del fármaco para obtener un derivado que sea más fácil de eliminar. La biotransformación de los fármacos se produce en casi todos los órganos del cuerpo, y comprende un conjunto diverso de reacciones químicas dentro de cuatro categorías generales: oxidación, reducción, conjugación e hidrólisis. El hígado es el órgano del cuerpo que tiene la mayor capacidad metabólica y, en consecuencia, la biotransformación hepática es la que se ha estudiado a la fecha con mayor profundidad. Para muchos compuestos activos, esta es la principal vía mediante la cual son eliminados del organismo¹.

La depuración de los fármacos se divide en tres fases: fase I (principalmente oxidación), fase II (conjugación) y fase III (transporte / eliminación). El papel de las tres fases en la disposición de los fármacos se describe en la Figura 3.1.



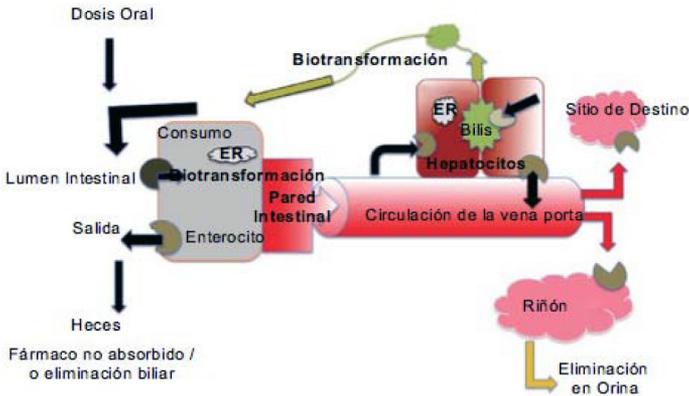


Figura 3.1 Papel de la biotransformación del fármaco por la fase I/II EMF en el retículo endoplásmico liso y por la fase III mediada por transportadores de fármacos unidos a la membrana (eflujo o funciones de captación) en la disposición y eliminación de fármacos en la bilis y la orina¹⁻².

3.2 ¿Por qué es importante estudiar la biotransformación de los fármacos?

En la Figura 3.2 se presenta el porcentaje de depuración metabólica catalizado por la fase I/II en comparación con la depuración renal o biliar caracterizada por la fase III mediada por los transportadores. La Figura 3.2 indica que la depuración por la fase I/II es la vía de eliminación predominante de los fármacos analizados (~ 70%), seguida por la depuración renal (~ 25%), mientras que aquellos que se eliminan predominantemente por depuración biliar representan menos de 5%³⁻⁴.

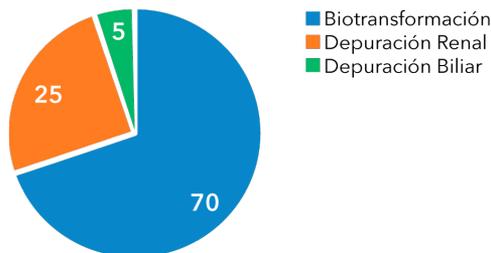


Figura 3.2 Contribución a la eliminación de fármacos por diferentes vías.



La biotransformación de fase I es conducida por enzimas que catalizan:

- (a) la hidroxilación (alifática, aromática u olefínica);
- (b) epoxidación (alifática o aromática);
- (c) desalquilación de grupos de funciones que contienen O-, N- o S-;
- (d) oxidación (N- o S-);
- (e) reducción (nitro, disulfuro, cetoaldehído u olefina), e
- (f) hidrólisis (amida, éster, carbamato o epóxido)

como se muestra en la Figura 3.3, se sabe que las reacciones de fase I introducen o desenmascaran grupos funcionales dentro de una molécula para aumentar su solubilidad¹⁻⁷.

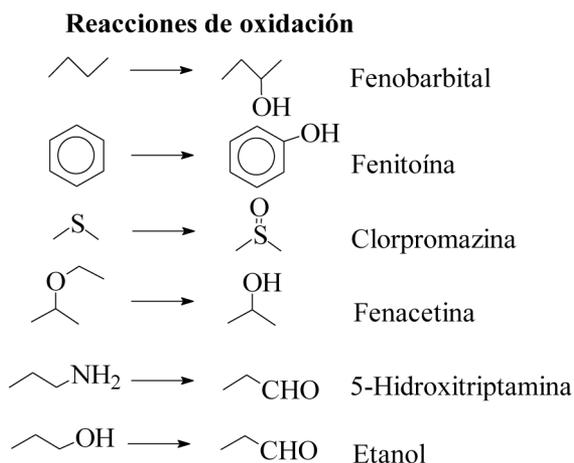


Figura 3.3 Ejemplos de reacciones catalizadas por la fase I mediada por el citocromo P450. La biotransformación es a través de reacciones de oxidación y reducción mediadas por NADPH que implican varias clases de fármacos y estructuras.



La oxidación implica la inserción de oxígeno, la eliminación de hidrógeno o la eliminación de electrones. Las reacciones de reducción implican exactamente los cambios opuestos. Las reacciones oxidativas son catalizadas por el citocromo P450, Monooxigenasas de Flavina (FMO), peroxidasa (ciclooxigenasas, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa), catalasa, aminooxidasas (monaminooxidasa MAO, diaminoxidasa DAO, poliaminoxidasa PAO), deshidrogenasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, carbonil reductasa) y xantina oxidasa. Para otras reacciones de fase I, las reacciones reductoras incluyen la reducción de los grupos carbonilo (como los aldehídos y las cetonas), la reducción de las quinonas, la reducción de los grupos nitro, los grupos azo y los disulfuros, y la reducción de los carbonos sustituidos con halógeno. Por último, hay reacciones de fase I que implican la hidrólisis de ésteres de carboxílicos, tioésteres, amidas, carbonatos, carbamatos, sulfatos, fosfatos, óxidos / hidratación. Estas reacciones son catalizadas por enzimas como las esterasas, peptidasas, proteasas, fosfatasas, nucleasas, fosfodiesterasas y epóxido hidrolasa⁶⁻⁷.

Las reacciones de fase II aquellas principalmente de conjugación, que incluyen glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugaciones de aminoácidos (glicina, ácido glutámico y taurina) y conjugación de glutatión (GSH)⁵⁻¹¹.

La fase III, que es el proceso mediado por transportadores, incluye a aquellos asociados a la glucoproteína P (P-gp), a la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MDRP) y los transportadores de polipéptidos 2 que transportan aniones orgánicos (OATP2) mismos que, como ya se mencionó, se expresan en muchos tejidos, como el hígado, el intestino, el riñón y el cerebro, donde proporcionan una barrera contra la penetración de fármacos y desempeñan funciones cruciales en la distribución y excreción de fármacos¹⁰⁻¹⁴.

La función principal de la depuración de fase II y fase III es la desintoxicación y el posterior transporte/eliminación de fármacos y otros xenobióticos. Consistente con esta función. La conjugación generalmente produce un metabolito más polar, mayor en peso molecular y cargado a pH fisiológico, características que lo hacen más susceptible como sustrato para su excreción definitiva en la orina o bilis. La mayoría de los conjugados de fase II son inactivos y no tóxicos; sin embargo, hay excepciones donde la bioactivación o los metabolitos reactivos se forman como resultado de la conjugación¹⁵⁻¹⁸.



Con la ayuda de transportadores, los fármacos penetran en los órganos metabolizadores. A medida que el fármaco lipofílico se oxida, hidroliza o reduce mediante reacciones de fase I, forma electrófilos o nucleófilos que experimentan conjugaciones con enzimas de fase II. Finalmente, en la fase III, los xenobióticos conjugados pueden procesarse aún más, antes de ser reconocidos por los transportadores de flujo de salida y bombeados fuera de las células. La biotransformación oxidativa mediada por citocromos P450 representa la vía más común para la depuración metabólica de la mayoría de los fármacos en el mercado¹⁹⁻²².

3.3 ¿Qué factores afectan la biotransformación de fármacos?

3.3.1 Biotransformación de Fase I

Las principales y más significativas reacciones de fase I en la disposición de fármacos son aquellas catalizadas por las enzimas del citocromo P450. Las enzimas P450 son responsables de la eliminación y la biotransformación del 75% de los fármacos en el mercado, mientras que CYP3A es responsable de más de 50% de estos fármacos y otros xenobióticos desarrollados (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Ejemplos de reacciones mediadas por P450 para fármacos conocidos y sustratos

Tipo de CYP	Fármaco
CYP1A2	Fenacetina
CYP3A4	Testosterona
CYP2A6	Cumarina
CYP2C9	Tolbutamida
CYP2C19	S-Mefenitoína
CYP2E1	Clorzoxazona
CYP2D6	Debrosiquina



El citocromo P450 humano es una superfamilia de proteínas asociadas a la membrana que se localizan en la membrana interna de las mitocondrias o en los compartimentos celulares del retículo endoplásmico (ER), que se pueden aislar de las fracciones subcelulares microsómicas de todos los órganos vivos. Son responsables del biotransformación de varios compuestos endógenos circulantes corporales, tales como los esteroides, las prostaglandinas, los ácidos biliares y la bilirrubina. Estas enzimas son proteínas celulares coloridas, que contienen hemopigmentos que absorben la luz a una longitud de onda de 450nm cuando se exponen al monóxido de carbono; por estas características, estas enzimas se denominan citocromo P450. El hígado es el principal órgano del cuerpo donde se detectan la expresión y la función de las enzimas P450. Además del hígado, las enzimas P450 se encuentran en los tejidos extrahepáticos, tales como el intestino, riñón, pulmón, corazón, cerebro y piel. Los P450 humanos pueden metabolizar solo uno o, en ocasiones, sustratos múltiples. Estas características explican su importancia en la medicina²³⁻²⁵.

El Proyecto del Genoma Humano ha identificado 57 genes humanos que codifican las diversas enzimas P450. Actualmente, se han identificado más de 10000 miembros del gen P450 en humanos y otras especies vivas, incluidas las bacterias y la levadura. El contenido de las principales isozimas P450 en el hígado ha sido determinado por varios investigadores que han indicado que el CYP3A, que se encuentra en un 40%, seguido de las enzimas CYP2C, son las principales enzimas P450 expresadas en los hepatocitos y medidas en la fracción subcelular microsomal del hígado como % de la proteína P450. La subfamilia CYP3A es la más abundante (~ 28% del contenido total de P450) e importante. Se ha demostrado que el CYP3A humano cataliza la biotransformación de la mayoría de los fármacos comercializados, como se indica en la Figura 3.4.

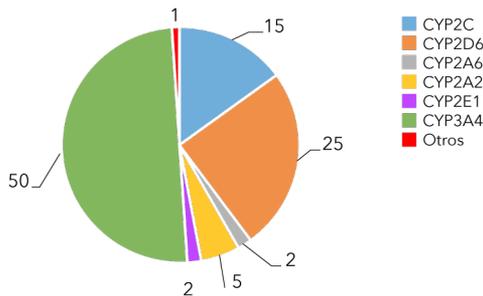


Figura 3.4 Contribución de las diferentes subfamilias y enzimas del CYP a la biotransformación de fármacos²².



En virtud de la relevancia que tiene CYP3A4 en la biotransformación de fármacos, se ha estudiado su inducción o inhibición como resultado de las interacciones fármaco-fármaco, fármaco-planta medicinal y fármaco-alimento. Los fármacos como la terfenadina, la cisaprida y el astemizol causan arritmias ventriculares cuando los inhibidores de CYP3A4, ketoconazol o eritromicina, se administran en conjunto con estos fármacos. En el intestino delgado, el CYP3A4 desempeña un papel importante en el biotransformación de primer paso (depuración presistémica) de los xenobióticos. La actividad catalítica del CYP3A4 disminuye longitudinalmente a lo largo del intestino delgado. Los fármacos populares, como la testosterona y el midazolam, pueden interactuar en dos sitios distintos de CYP3A4 llamados sitios de esteroides y benzodiazepinas, respectivamente. Aunque tanto el CYP3A4 como el CYP3A5 se expresan en el hígado y el intestino, el CYP3A5 es la forma predominante expresada en los tejidos extrahepáticos. La expresión de CYP3A5 es polimórfica; se han reportado cinco variantes alélicas de CYP3A5. CYP3A7 es una enzima fetal y participa en la activación de fármacos contra los metabolitos teratogénicos²⁶⁻³¹.

Las reacciones de hidroxilación reemplazan un átomo de hidrógeno (C - H) con un grupo hidroxilo o para convertirse en (C-OH). La hidroxilación de un carbono alifático o un anillo aromático es una de las reacciones más comunes del biotransformación de los fármacos. La otra reacción de biotransformación común es la hidroxilación en el carbono α a los heteroátomos, lo que resulta en la escisión oxidativa de la molécula. Aunque la hidroxilación es la reacción oxidativa P450 dependiente de NADPH más común, la hidrólisis también puede estar mediada por reacciones oxidativas P450 no dependientes de NADPH, como con las hidrolasas. El ciclo catalítico de oxidación P450 es un proceso complejo de varios pasos, que implica la transferencia electrónica mediada por el ión Fe^{3+} del grupo Hem del citocromo, la reducción de este ión, su unión a oxígeno, la transferencia al xenobiótico y la liberación del mismo³¹⁻³³.

La actividad reductasa de P450s implica la transferencia directa de electrones a sustratos reducibles, como las quinonas, y se produce fácilmente en condiciones anaeróbicas³⁰⁻³¹.



Las reacciones de epoxidación introducen un átomo de oxígeno en el doble enlace triple carbono-carbono. El anillo aromático se puede someter a epoxidación mediada por CYP. La epoxidación da como resultado la formación de productos inestables, que se hidrolizan por epoxidehidrólisis para formar dioles o reaccionan con grupos nucleófilos en macromoléculas para iniciar efectos toxicológicos. Los epóxidos también pueden ser biotransformados a metabolitos estables³⁰⁻³¹.

La oxidación de heteroátomos agrega un átomo de oxígeno a nitrógeno o azufre. Las aminas aromáticas y las aminas secundarias o terciarias se someten a N-oxidación, que está mediada por un amplio espectro de enzimas que incluyen P450s (como CYP3A4) y FMO como en el caso de la formación de N-óxido de voriconazol). Esta reacción es catalizada por CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, FMO3 / FMO1³¹⁻³².

En las reacciones de deshidrogenación se reemplazan dos átomos de hidrógeno con dobles enlaces. Las reacciones de deshidrogenación ocurren por la abstracción de un átomo de hidrógeno por la especie (Fe-O)³⁺ para formar un radical centrado en el carbono. La abstracción de otro átomo de hidrógeno da como resultado la formación de un doble enlace²⁷⁻³¹.

3.3.2 Biotransformación de Fase II

En la Tabla 3.2, se mencionan las principales enzimas responsables de las reacciones de biotransformación de Fase II.

Tabla 3.2 Reacciones de fase II.

Enzima	Sustrato
UDP-glucuronosil transferasa (UGT)	R-OH, Ar-OH
Sulfotransferasa (SULT)	Ar-OH
Glutación S-transferasa (GST)	R-X (X es un grupo saliente como el halógeno)
N-acetil transferasa (NAT)	Ar-NH ₂
Catecolamin O-metiltransferasa (COMT)	Catecol



Las reacciones de glucuronidación son catalizadas por una familia de enzimas conocidas como UDP-Glucuronosiltransferasas(UGT). Estas reacciones implican la conjugación de una molécula aceptora con ácido glucurónico. La fuente de ácido glucurónico es un cosustrato conocido como UDP ácido glucurónico (UDPGA). El grupo funcional de la molécula aceptora es típicamente $-OH$, $-OOH$, $-NH$ e incluso $-CH$ y $-SH$, que podría haber estado en la molécula de forma nativa, o haberse generado como resultado de las reacciones de Fase I. En general, la reacción de conjugación con glucurónido aumenta la solubilidad de los compuestos xenobióticos de modo que se excretan más fácilmente en la bilis y la orina. Muchos fármacos están glucuronidados por las enzimas UGT, incluidos el paracetamol, la codeína, la morfina, el S-naproxeno, el oxazepam y la zidovudina. Como la mayoría de las enzimas de fase II, los UGT también son capaces de biotransformar importantes sustratos endógenos, como la bilirrubina, los ácidos biliares, los esteroides y los glicolípidos³³⁻³⁹.

La concentración de UDPGA en el hígado humano varía de 201 a 349 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ de hígado, lo que hace que la reacción de glucuronidación sea una vía metabólica de fase II y una depuración predominantes en los seres humanos. Las UGT están presentes en el hígado, pulmón, piel, intestino, riñón, cerebro y otros tejidos. Son enzimas unidas a la membrana con un peso molecular en el rango de 50 a 60 kDa y están ubicadas en el retículo endoplásmico liso de la célula, y la conjugación UGT ocurre únicamente dentro de este organelo. Las UGT constan de cuatro familias, UGT1, UGT2, UGT3 y UGT8, aunque UGT1 y UGT2 son las dos familias involucradas en el 87% del biotransformación hepática⁴⁰⁻⁴⁶.

La inhibición *in vitro* de la actividad de UGT se ha informado para varios fármacos, como tacrolimus, ciclosporina y diclofenaco. Las IDD que involucran glucuronidación parecen ser menos frecuentes que las identificadas para CYP450, lo que podría ser resultado los valores más altos de K_m del sustrato ($> 300 \mu\text{M}$) en comparación con los de CYP450 (K_m , típicamente alrededor de $3 \mu\text{M}$)⁴³⁻⁴⁵.

La expresión y las actividades de la enzima UGT son variables entre las poblaciones humanas debido al polimorfismo genético, más comúnmente asociado con las isoformas UGT1A1, UGT1A6 y UGT2B7. Las enfermedades hereditarias como los síndromes de Gilbert y Crigler-Najjar ocurren debido al polimorfismo UGT1A1, que reduce la capacidad del individuo para metabolizar la bilirrubina, causando hiperbilirrubinemia. En el síndrome de Gilbert, solo se produce ictericia menor en aproximadamente 3 a 13% de la población y es menos grave, ya que la expresión de UGT1A1 es $\sim 30\%$ de lo normal⁴⁴⁻⁴⁷.



La glucuronidación se considera un proceso reversible; una vez que los metabolitos de glucurónido entran en el intestino, se exponen a enzimas de la microflora intestinal, como la β -glucuronidasa, y se vuelve a liberar el fármaco original. Con el proceso de recirculación enterohepática, el fármaco original a menudo se reabsorbe en el intestino delgado.

Además de las UGT, las reacciones de conjugación de fase II implican la unión de n grupo sulfato, GSH, metilo y acetilo, catalizadas como se mencionó en la Tabla 3.2 por enzimas conocidas como sulfoniltransferasas (SULT), glutatión S-transferasas (GST), metiltransferasas (MT) y N-acetiltransferasas (NAT), respectivamente. La glucuronidación es la conjugación más común, que representa aproximadamente el 35% de todas las reacciones de conjugación. SULTs, GSTs, y NAT son responsables de reacciones metabólicas conjugativas en menor medida, en un 20%, 15% y 10%, respectivamente. Al igual que en las reacciones de fase I, las enzimas de conjugación también están involucradas en importantes vías biosintéticas y bioquímicas de biomarcadores endógenos⁴⁷⁻⁵¹.

La reacción de sulfonación es catalizada por una gran familia de enzimas conocidas como SULT. Las SULT catalizan la transferencia de un grupo sulfonato (SO_3^-) desde el 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) a un $-\text{COH}$, un $-\text{NOH}$ o un grupo $-\text{NH}$. La sulfonación puede ser directa, u ocurrir después de la oxidación a través del biotransformación de la fase I. La capacidad de sulfonación está limitada por la cantidad de PAPS disponible *in vivo* para la conjugación. La glucuronidación normalmente compensa la vía de sulfonación cuando esta última se satura. Así, la sulfonación y la glucuronidación se equilibran entre sí. Similar a la glucuronidación, la conjugación con sulfato es un proceso reversible y los conjugados de sulfato pueden ser desulfatados por las sulfatasas presentes en la microflora intestinal. Las SULT se expresan en la mayoría de los tejidos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, piel, mama, gastrointestinal, cerebro y plaquetas, con los niveles más altos en el intestino delgado y el hígado. Las SULT están principalmente aisladas de la fracción subcelular citosólica o están unidas a la membrana del aparato de células de Golgi. Las SULT que están unidas a la membrana no están implicadas en el biotransformación de los fármacos, pero catalizan la conjugación de macromoléculas endógenas como las proteínas y los péptidos. Varios investigadores han informado sobre el papel de la sulfonación en el biotransformación de varios fármacos; el más conocido es su papel en la biotransformación del paracetamol y su toxicidad. Cabe destacar que, debido a la ontogenia de las SULT, la toxicidad del paracetamol en pacientes pediátricos es menor en comparación con las toxicidades observadas en adultos.



Se han reportado pocas o ninguna IDD clínicamente relevantes que involucre las SULT⁵²⁻⁵⁶.

La reacción de conjugación con GST depende de que el GSH forme productos menos reactivos que se excretan fácilmente. El nivel intracelular de GSH es alto, alcanzando 8-10 mM en algunos tejidos, lo que es importante para la actividad de GST. Los productos finales de la conjugación con GST se excretan mediante el transporte de proteínas a la bilis o se convierten en conjugados de N-acetil-cisteína y se excretan en la orina. Las GST tienen sustratos endógenos, como las prostaglandinas. La mayoría de las GST son enzimas citosólicas, pero hay ejemplos de GST unidas a la membrana como MGST1, MGST2 y MGST3. Al igual que los UGT y las SULT, existen diferentes isoformas de GST. Hay siete clases de GST citosólicos: alfa, mu, pi, sigma, theta, omega y zeta. Los polimorfismos también se encuentran dentro de cada clase de GST; el mayor impacto del polimorfismo de GST en el biotransformación de los fármacos surge en las clases mu y theta. Las personas portadoras de genes incompetentes no tienen enzimas activas y están asociadas con un mayor riesgo de ciertos cánceres⁵⁷⁻⁵⁸.

Las metiltransferasas (MT) catalizan la transferencia de un grupo metilo de un cosustrato conocido como S-adenosilmetionina (SAM) a un grupo funcional oxígeno, azufre o nitrógeno en el sustrato. Hay más de 100 MT; sin embargo, se ha encontrado que solo unas cuantas catalizan el biotransformación de los fármacos, incluida la catecol metiltransferasa (COMT), la tiol metiltransferasa (TMT), la tiopurina metiltransferasa (TPMT) y la nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT). La COMT cataliza la O-metilación de catecoles y catecolaminas como la dopamina. La COMT requiere Mg²⁺ por su actividad catalítica. Los sustratos endógenos de COMT incluyen l-dopa, dopamina, norepinefrina y epinefrina. Los fármacos metabolizados por la COMT incluyen rimiterol, dobutamina, dihidroxifenilserina, isoprenalina y carbidopa. La metilación difiere de la sulfonación, la glucuronidación y la conjugación con GSH, ya que los conjugados de metilo son menos polares que el fármaco original y, por lo tanto, no pueden eliminarse más fácilmente. Para la IDD, la COMT está sujeta a inhibición por fármacos de nitrocatecol como la entacapona, la nitecapona y la tolcapona. La COMT es polimórfica en humanos. El polimorfismo genético causa una actividad enzimática reducida de 3 a 4 veces y está vinculado a un mayor riesgo de cáncer de mama⁵⁹.



Las N-acetiltransferasas de arilamina catalizan la transferencia de un grupo acetilo de acetil coenzima A a arilaminas y N-hidroxiarilaminas como el ácido p-aminobenzoico. Al igual que la metilación, la N-acetilación difiere de otras reacciones de conjugación, ya que también produce metabolitos que son menos polares (menos solubles en agua) que sus formas de fármaco original. Hay dos formas humanas de NAT, NAT1 y NAT2. Los fármacos que son sustratos NAT incluyen isoniazida, hidralazina, fenelzina, sulfametazina, endralazina, ácido p-aminosalicílico, procainamida, nitrazepam y dapsona. A pesar de las similitudes entre las dos isoformas, son muy diferentes en su especificidad de sustrato y distribución tisular. NAT1 se expresa ampliamente en muchos tejidos, mientras que NAT2 se encuentra principalmente en el hígado y el intestino. Para la IDD, los fármacos como el ketoprofeno, el ibuprofeno, el paclitaxel y la salicilamida son inhibidores de los NAT. Ambas formas son polimórficas; sin embargo, el polimorfismo de NAT2 se ha estudiado más ampliamente y se ha implicado en la variabilidad de la actividad terapéutica y la toxicidad de la isoniazida y otros fármacos de hidracina. Se ha encontrado que la razón de aparición de metabolizadores pobres/intermedios en varias poblaciones étnicas es muy variable, pero se ha informado que es aproximadamente 10-30% en los asiáticos y 50-60% en los caucásicos⁶⁰⁻⁶³.

3.3.3 Biotransformación de Fase III

La biotransformación de fase III se conoce como el proceso de excreción o eliminación de metabolitos de fármacos en la bilis u orina a través de proteínas transportadoras. Este es el único mecanismo para trasladar los metabolitos polares desde los hepatocitos a la bilis o a la circulación sistémica, para que a partir de esta última sean eliminados mediante células tubulares proximales renales. El mecanismo de salida es mediado por proteínas de transporte, las ABC y SLC64-68. Para los fármacos que pertenecen a la Clase I del BCS, caracterizado por alta solubilidad/alta permeabilidad, es poco probable que los transportadores de captación o de salida tengan algún efecto sobre el biotransformación/exposición de estos fármacos. En contraste, se espera que tanto los transportadores de captación como los de salida modulen la biotransformación y salida de los fármacos candidatos que se clasifican como de baja solubilidad y alta permeabilidad (Clase II), alta solubilidad y baja permeabilidad (Clase III) y baja solubilidad y baja permeabilidad (Clase IV)⁶⁹⁻⁷².



3.3.4 Efecto de los factores fisiológicos en la biotransformación de fármacos

Se considera que el grado de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas tiene una influencia significativa en la velocidad de difusión del fármaco entre el plasma y los tejidos y, por lo tanto, influye en su velocidad de eliminación, toda vez que el fármaco libre es susceptible de biotransformación, como se define en las siguientes ecuaciones.

La velocidad de biotransformación del fármaco por la enzima particular que cataliza su(s) reacción(es) metabólica(s) se determina mediante la ecuación de Michaelis-Menten para la cinética enzimática:

$$\text{Velocidad} = \frac{V_{\text{máx}} [\text{Fármaco}]}{K_m [\text{Fármaco}]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Se pueden determinar experimentalmente las constantes de Michaelis-Menten $V_{\text{máx}}$ y K_m para calcular la depuración intrínseca de una vía enzimática particular. La relación $V_{\text{máx}}/K_m$ se puede escalar a la depuración intrínseca de todo el cuerpo según las ecuaciones 3.2 y 3.3:

$$Cl_{\text{int}} = \frac{V_{\text{máx}}}{K_m} * \text{Factor de escala} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$\left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) * \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right)$$

$$\text{Factor de escala} = \frac{\left[\text{MPPG} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) * \text{peso de hígado (g)} \right]}{\text{peso corporal (Kg)}} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

donde MPPG es miligramo proteína microsomal por gramo de hígado. La depuración *in vivo* del fármaco se puede calcular basándose en los datos *in vitro* utilizando el modelo de disposición hepática bien agitado, como se muestra en la Ecuación 3.4⁶⁴:

$$Cl_{\text{predicho}} = Q_h * f_u * \frac{Cl_{\text{int}}}{Q_h + f_u * Cl_{\text{int}}} \quad \text{Ecuación 3.4}$$



Los determinantes de la depuración metabólica de un órgano en particular están indicados por la siguiente ecuación de modelo bien agitado⁷³:

$$Cl_{org \text{ predicho}} = Q_{org} * fu * \frac{Cl_{int}}{Q_{org} + fu * Cl_{int}} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde CL_{org} y CL_{int} son la depuración del órgano y la depuración intrínseca (volumen/tiempo), Q_{org} es la tasa de perfusión del órgano o su flujo sanguíneo y fu , es la fracción de fármaco no unida en la sangre.

Para los fármacos que son metabolizados eficientemente y tienen altos valores de depuración intrínseca, la ecuación anterior se resume a lo siguiente:

$$Cl_{org \text{ predicho}} = Q_{org} * fu * \frac{Cl_{int}}{fu * Cl_{int}} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Así,

$$Cl_{org \text{ predicho}} = Q_{org} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

La depuración del órgano cuando tiene una alta velocidad de depuración intrínseca es, por lo tanto, limitada por la velocidad de perfusión e independiente tanto de la unión a proteínas como de la depuración intrínseca.

Para los fármacos que no son buenos sustratos (es decir, con bajo coeficiente de depuración intrínseca), la ecuación para la depuración metabólica de los órganos se reajusta a lo siguiente:

$$Cl_{org \text{ predicho}} = Q_{org} * fu * \frac{Cl_{int}}{Q_{org}} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Así,

$$Cl_{org \text{ predicho}} = fu * Cl_{int} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

La fracción libre en sangre, o fu , es ahora un determinante crucial de la depuración metabólica hepática. El flujo sanguíneo hepático (Q_H) puede influir en la depuración hepática cuando la eliminación hepática está limitada por la velocidad de transporte de fármacos hacia el hígado y no por la actividad enzimática⁷³.



Como se discutió en el capítulo 2, los cambios en el perfil del sujeto, como el estado de la enfermedad, la edad, el embarazo y la dieta modificarán los niveles de proteínas plasmáticas y, por ende, pueden afectar la depuración del fármaco por biotransformación⁷⁴⁻⁷⁵.

Los cambios en la biotransformación en función de la edad son importantes, toda vez que existen diferencias claras en las poblaciones pediátricas en comparación con los adultos, en parámetros tales como⁷⁶⁻⁸⁶:

1. Enzimas de fase I: enzimas oxidativas (P450 CYP1A2 y CYP3A7 versus CYP3A4), enzimas reductivas y enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, en el hígado adulto, el CYP3A4 comprende entre 10 y 50% de las enzimas P450 totales, mientras que el CYP3A7 es la enzima dominante en el hígado fetal. Con respecto a otras vías oxidativas, los neonatos nacen con una alta expresión de FMO-1 y baja de FMO-3, pero esto se revierte rápidamente y FMO-3 se convierte en la forma dominante que aumenta hacia la edad adulta. Las dosis corregidas por peso de los fármacos predominantemente metabolizados por las enzimas P450 en niños, en particular el CYP3A4, son 2 veces más altas que las dosis en adultos para lograr concentraciones terapéuticas equivalentes.
2. Enzimas de fase II: NAT, UGT, SUL. A diferencia de los CYP y otras vías oxidativas, la capacidad de UGT es muy baja al nacer y solo aumenta muy gradualmente. La principal isozima UGT que metaboliza la bilirrubina es la UGT1A1, y su actividad es baja alrededor del momento del nacimiento. Los niveles de adultos de las UGT aparecen a partir de los 6 meses de edad.
3. Al nacer, las concentraciones de albúmina sérica humana (ASH) están cerca de los niveles en adultos (75-80%), mientras que la AGP es inicialmente la mitad de la concentración en adultos.



Hay pruebas considerables en modelos animales de que la eliminación de los fármacos varía entre los sexos, en parte relacionada con la posesión o la falta de posesión de determinados CYP. Los efectos del género en los seres humanos no están tan bien caracterizados, pero algunos CYP parecen tener actividades más altas en los hombres, como el CYP1A2, lo que conduce a una mayor depuración en los hombres con fármacos como la clozapina. En general, las hembras tienen menor UGT y CYP2E1, mayor CYP3A4 y CYP2B6, pero las mismas actividades CYP2C9 y CYP2D6. Las enzimas del biotransformación de los fármacos son incluso diferentes en hombres y mujeres, lo que lleva a diferencias de género en la farmacocinética. Recientemente, un estudio demostró que el género, y quizás más importante, las diferencias en los niveles de hormonas sexuales en plasma en las especies femeninas, impulsa las diferencias dependientes del género en los perfiles de expresión de las enzimas UGT y los transportadores de flujo de salida. Estas diferencias afectan significativamente la depuración metabólica y la biodisponibilidad sistémica de los compuestos eliminados a través de esta vía de eliminación⁸⁷⁻⁹¹.

Los cambios en las actividades hepáticas e intestinales debidos a la enfermedad renal crónica se manifestaron en la disminución de la depuración de fármacos con un mecanismo de depuración dependiente del biotransformación hepática en pacientes. Sin embargo, el foco principal en términos de enfermedad en la capacidad metabólica suele estar en el hígado. Cualquier alteración grave de la estructura o el biotransformación hepática, ya sea por enfermedad (hepatitis o cáncer) o por abuso (cirrosis), afectará fuertemente la capacidad del órgano para cumplir sus funciones bioquímicas y fisiológicas principales, así como también a la expresión de las enzimas. La pérdida física de los hepatocitos funcionales, combinada con una pobre perfusión de órganos, es el factor principal en la pérdida drástica de la capacidad metabólica del hígado cirrótico. Además, la expresión de CYP, como CYP3A y CYP2E1, se reduce significativamente en los hepatocitos supervivientes. La hepatitis C causa una regulación negativa en la expresión de la mayoría de los CYP, como CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 y CYP3A5, pero aumenta la expresión de otros, como CYP3A7⁹²⁻⁹⁷.



Muchas de las enzimas biotransformadoras y los transportadores de fármacos muestran un polimorfismo genético, que influye principalmente en los niveles de expresión y función. Muchas de estas enzimas muestran polimorfismos genéticos con frecuencias que varían entre diferentes etnias, causando variaciones entre las poblaciones humanas. En general, las poblaciones humanas se pueden caracterizar genéticamente como (1) ultrametabolizadores (Ums), que metabolizan el sustrato tan rápidamente debido a la duplicación de genes y los fármacos que mantienen una alta depuración, por lo que los niveles terapéuticos a menudo no pueden alcanzarse en la práctica clínica en estos individuos; (2) metabolizadores pobres (PM), individuos que tienen una función enzimática incompetente (homocigótica) que resulta en una falta de biotransformación de los sustratos de CYP; y (3) metabolizadores intermedios (IM), heterocigotos con expresión parcial de CYP competentes, que dan como resultado la eliminación intermedia del fármaco. Los efectos secundarios más graves a menudo se notan con IM y PM, y los sustratos que requieren activación metabólica pueden demostrar una eficacia clínica subóptima⁹⁷⁻¹⁰¹.

3.4 Métodos para la determinación de la biotransformación de fármacos

Debido a la función clave que desempeña, comprender la biotransformación es un aspecto crítico para el desarrollo de nuevos fármacos.

Existen varios modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* que a menudo se emplean a lo largo del descubrimiento y desarrollo de fármacos. El propósito de cada modelo para dilucidar la disposición metabólica de las moléculas de fármacos nuevas y existentes se analizará a continuación.



3.4.1 Modelos *in vitro* de biotransformación de fármacos

Cuando se necesita estudiar la biotransformación en un sistema *in vitro* para simplificar la investigación y minimizar la variabilidad en las pruebas *in vivo*, se pueden usar hepatocitos para evaluar todas las rutas metabólicas posibles en paralelo dentro del mismo experimento. En caso de que deban abordarse preguntas o vías específicas, se puede usar una fracción subcelular como microsomas (Figura 3.5). En este caso, los hepatocitos se lisan homogeneizando el tejido hepático, seguido de una centrifugación diferencial para segregar la fracción subcelular deseada, la denominada fracción S-9 (sobrenadante de 9,000×g de sedimentación), que contiene citosol y fragmentos liposomales del retículo endoplásmico liso llamados microsomas. La preparación de S-9 es una herramienta *in vitro* adecuada para dilucidar casi todas las vías importantes del biotransformación de los fármacos. Los microsomas se pueden separar del citosol mediante una sedimentación más fuerte de la fracción S-9 a 105,000×g, lo que permite preparar enzimas de biotransformación de fármacos unidas a la membrana (por ejemplo, P450, FMO)¹⁰²⁻¹¹⁴.

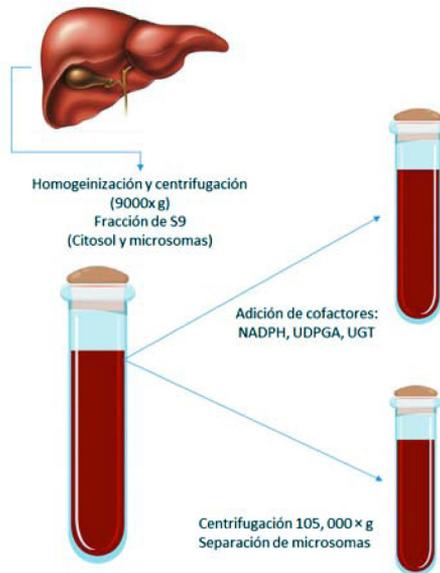


Figura 3.5 Preparación de microsomas o fracción S9 para pruebas de biotransformación *in vitro*.



Los modelos *in vitro* de biotransformación de fármacos pueden ocupar enzimas aisladas, células intactas como los hepatocitos o modelos de infusión de órganos completos. Cada sistema modelo tiene su propia aplicación en el estudio de la biotransformación de los fármacos en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Los sistemas de modelos *in vitro* más comúnmente empleados son S-9, microsomas y hepatocitos. Sin embargo, las enzimas individuales expresadas recombinantes también se utilizan con frecuencia¹⁰²⁻¹⁰³.

Las fracciones subcelulares tales como S9, citosol y microsomas preparados a partir de homogeneizado de tejido completo que se procesan en amortiguador son las herramientas más utilizadas para estudiar el biotransformación de los fármacos, las IDD y el perfil de metabolitos en todos los órganos del cuerpo y en especies animales. Dependiendo del tejido, los aislamientos subcelulares pueden prepararse a partir de la homogeneización de todo el órgano o de la homogeneización de un segmento específico¹⁰²⁻¹¹⁴.

El sistema de enzimas aisladas es una herramienta útil para evaluar el mecanismo molecular del biotransformación del fármaco y la depuración mediada por tales enzimas. Además, la enzima expresada puede ser una herramienta óptima para determinar el fenotipo de la reacción. El ensayo se realiza en incubación, donde la proteína enzimática se agrega en una concentración igual a su contenido fisiológico en el órgano específico *in vivo*, que es extremadamente bajo; por lo tanto, se considera como una ventaja, ya que disminuye el potencial de unión no específica. La familia de enzimas únicas más comúnmente empleadas son las isozimas P450; sin embargo, ahora están disponibles otras reacciones enzimáticas oxidativas y transportadores de fármacos, como FMO, UGT, GST, SULT, OATP, MRPs y P-gp. En general, el sistema de una enzima aislada tenderá a poner demasiado énfasis en la importancia o potencia de las reacciones metabólicas; sin embargo, son extremadamente útiles para descomponer las vías metabólicas complejas en vías o enzimas individuales¹⁰⁴⁻¹⁰⁸.

Las células primarias aisladas de tejidos y líneas celulares se han utilizado para evaluar una variedad de funciones de biotransformación de fármacos; sin embargo, las células primarias tienden a emplearse más a menudo para determinar de manera rutinaria la inducción enzimática, el perfil de metabolitos y evaluar el papel de los transportadores de fármacos en la eliminación de fármacos. Para la aplicación de alto rendimiento en el descubrimiento temprano de fármacos, a menudo se usan líneas celulares¹¹³⁻¹¹⁵.



3.4.2 Modelos *in vivo* de biotransformación de fármacos

Los modelos *in vitro* del biotransformación de fármacos son extremadamente útiles para estudiar reacciones específicas, mecanismos o relaciones de actividad de estructura; sin embargo, se requieren sistemas *in vivo* para comprender factores adicionales que pueden contribuir al tipo de biotransformación, la tasa de biotransformación u otras vías de eliminación en la disposición general de un fármaco o metabolitos.

Los estudios de biotransformación de fármacos *in vivo* más comunes se basan en matrices biológicas de animales, como plasma, orina y bilis, así como en heces en algunas situaciones. Se toman muestras de plasma y orina de animales intactos; sin embargo, la recolección de la bilis requiere de animales canulados en el conducto biliar¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Los balances de masa (MB) son considerados como un estudios *in vivo* esenciales. Se administra el fármaco radiomarcado en animales por vía oral o intravenosa (o ambos), y la radioactividad se mide a partir de la bilis, la orina, las heces, el $^{14}\text{CO}_2$ exhalado, las canales de animales y los lavados de jaulas. El propósito de este estudio es (1) determinar las principales vías de eliminación del fármaco y el material relacionado con el fármaco; (2) determinar la recuperación total del material radiomarcado (lo que entra debe salir); y (3) realizar un perfil metabólico de las diversas matrices recolectadas para verificar que los metabolitos humanos generados son los mismos que los formados en cantidades suficientes en los modelos de toxicología¹¹⁶⁻¹¹⁸.



El desarrollo de modelos animales mejorados para predecir la exposición sistémica a fármacos y metabolitos en el hombre lo antes posible en el proceso de descubrimiento de fármacos se considera fundamental para evitar retrasos en los proyectos. Los avances recientes en tecnología han evolucionado y se han expandido hacia el uso de una variedad de modelos de animales modificados genéticamente (GEMA) para comprender mejor el papel que desempeñan las enzimas biotransformadoras, los factores de transcripción nuclear y los transportadores en la eliminación de fármacos y en la regulación de sustratos endógenos y, por lo tanto, evaluar los mecanismos asociados con las toxicidades inducidas por fármacos. Existen numerosos modelos de GEMA generados para el biotransformación de fármacos y proteínas transportadoras que han proporcionado una mayor caracterización y comprensión mecánica de las proteínas que contribuyen a la eliminación de los fármacos. Un movimiento hacia la "humanización" de las especies animales de laboratorio es el avance tecnológico de poder eliminar el gen que codifica para el homólogo animal de un gen particular y transfectar el homólogo humano en el genoma del ratón. Se ha demostrado que el modelo de ratón quimérico es útil para evaluar la biotransformación, la distribución, y la toxicidad de muchos xenobióticos¹²¹⁻¹²³.

Para los órganos perfundidos, se utilizaron preparaciones de hígado, corazón, pulmón, riñón, cerebro, intestino e intestino-hígado para estudiar el biotransformación, se informaron hígado e intestino. La perfusión de órganos generalmente se limita a animales más pequeños, como ratas y, en menor medida, conejos¹²⁴.



3.5 Referencias

1. Talevi A, Quiroga P, Ruiz M. Procesos biofarmacéuticos. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata. 2016.
2. Gonzalez J, Nebert D. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant "war-fare," molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990;6:182-186.
3. Guengerich E. Cytochromes p450, drugs, and diseases. *Mol Intervent* 2003;3:194-204.
4. Yanni S. Translational ADMET for drug therapy. Hoboken NJ. John Wiley & Sons. 2015.
5. Meyer U. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996;24:449-459.
6. Parkinson A, Ogilvie BW. Biotransformation of xenobiotics, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008.
7. Penner N, Woodward C, Prakash C. Drug metabolizing enzymes and biotransformation reactions. New York: Wiley, 2010.
8. Nebert D, Nelson D, Coon M, Estabrook R, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez F, Guengerich F, Gunsalus I, Johnson E. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 1991;10:1-14.
9. Nelson D, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J, Feyereisen R, Waxman D, Waterman M, Gotoh O, Coon M, Estabrook R, Gunsalus I, Nebert D. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42.
10. Banoglu E. Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens. *Curr Drug Metab* 2000;1:1-30.
11. King C, Rios G, Green M, Tephly T. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000;1:143-161.
12. Brinkmann U, Eichelbaum M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDRI. *Pharmacogenomics J* 2001;1:59-64.
13. Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2001;2:51-64.
14. Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deriv Rev* 2002;54:1343-1352.



15. Kim R. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur J Clin Invest* 2003;33 Suppl 2:1-5.
16. Mizuno N, Niwa, T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003;55:425-461.
17. Staudinger J, Madan A, Carol K, Parkinson A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos* 2003;31:523-527.
18. Hinson J, Forkert P. Phase II enzymes and bioactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1407-1413.
19. Schilter B, Turesky R, Juillerat M, Honegger P, Guigoz Y. Phase I and phase II xenobiotic reactions and metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in aggregating liver cell cultures. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1087-1096.
20. Rushmore T, Kong A. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of Phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2002;3:481-490.
21. Clarke S, Jones B. Human cytochromes P450 and their role in metabolism-based drug-drug interactions. In: *Drug-drug interactions*, 2nd ed., ed. Rodrigues AD. New York: Informa Healthcare, 2008, 53-85.
22. Xu L, Das B, Prakash C. CYP450 enzymes in drug discovery and development: an overview. In: *Encyclopedia of drug metabolism and interactions*, ed. Lyubimov AV. Hoboken, NJ: Wiley, 2012, 10: 1-35.
23. Brown C, Reisfeld B, Mayeno A. Cytochrome P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 2008;40:1-100.
24. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958;75:376-386.
25. Ortiz de Montellano P, ed. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.
26. Paine M, Khalighi M, Fisher J. Characterization of interintestinal and intra-intestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1552-1562.
27. Williams P, Cosme J, Vinkovic D. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 2004;305:683-686.



28. Kuehl P, Zhang J, Lin Y. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-391.
29. Ekins S, Stresser D, Williams J. In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:161-166.
30. Gellner K, Eiselt R, Hustert E. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 2001;11:111-121.
31. Guengerich F. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001;14:611-650.
32. Ling J, Johnson K, Miao Z. Metabolism and excretion of erlotinib, a small molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos* 2006;34:420-426.
33. Yanni S, Annaert P, Augustijns P, Bridges A, Gao Y, Benjamin D, Thakker D. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2008;36(6):1119-1125.
34. Miners J, Mackenzie P. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 1991;51:347-369.
35. Otake Y, Hsieh F, Walle T. Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2002;30(5):576-581.
36. Cappiello M, Giuliani L, Pacifici G. Distribution of UDP glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;41:345-350.
37. Strassburg C, Nguyen N, Manns M. UDP glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* 1999;116:149-160, 259-265.
38. Kurkela M, Garcia-Horsman A, Luukkanen L. Expression and characterization of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *J Biol Chem* 2003;278(6):3536-3544.
39. Ouzzine M, Barre L, Netter P. The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation. *Drug Metab Rev* 2003;35(4):287-303.



40. Kiang T, Ensom M, Chang T. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 2005;106:97-132.
41. Williams J, Hyland R, Jones B. Drug-drug interactions for UDP- glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCI/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 2004;32(11): 1201-1208.
42. Garnett W. Lamotrigine-interaction with other drugs. In: *Anti-epileptic drugs*, 5th ed., ed. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, et al. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 300-331.
43. Miners J, Mackenzie P. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 1991;51:347-369.
44. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 2003;3:136-158.
45. Van Der Veere C, Sinaasappel M, McDonagh A. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type I: report of a world registry. *Hepatology* 1996;24(2):311-315.
46. Evans W, Reilling M. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-491.
47. Pacifici G. Sulfation of drugs. In: *Human cytosolic sulfotransferases*, ed. Pacifici GM, Coughtrie MW. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005, 157-177.
48. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3-7.
49. Mannisto P, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* 1999;51(4):593-628.
50. Butcher N, Boukouvala S, Sim E. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics J* 2002;2:30-42.
51. Makarova S. Human N-acetyltransferases and drug-induced hepatotoxicity. *Curr Drug Metab* 2008;9(6):538-545.
52. Gamage N, Barnett A, Hempel N. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 2006;90(1):5-22.
53. Yanni S, Allegaert K. Drug metabolism and interactions in pediatric patients. In: *Encyclopedia of drug metabolism and interactions*, ed. Lyubimov AV. Hoboken, NJ; Wiley, 2012, 11:1-44.



54. Strott C. Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 2002;23:703-732.
55. Raftogianis R, Wood T, Otterness D. Phenol SULT pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:298-304.
56. Wang Y, Spitz M, Tsou A. Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphism as a predisposition factor for lung cancer: a case control analysis. *Lung Cancer* 2002;35:137-142.
57. Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Tox-icol* 2005;45:51-88.
58. Townsend D, Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003;57:145-155.
59. Guldberg H, Marsden C. Catechol-O-methyltransferases, pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol Rev* 1975;27:135-206.
60. Wu H, Dombrovsky L, Tempel W, et al. Structural basis of substrate-binding specificity of human arylamine N-acetyltransferases. *J Biol Chem* 2007;282(41):30189-30197.
61. Graf T, Broly T, Hoffman F. Prediction of phenotype for acetylation and for debriso- quine hydroxylation by DNA-test in healthy human volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:399-403.
62. Yamamoto M, Sobue G, Mukoyama M. Demonstration of slow acetylator genotype of IV-acetyltransferase in isoniazid neuropathy using an archival hematoxylin and eosin section of a sural nerve biopsy specimen. *J Neurol Sci* 1996;135:51-54.
63. Agundez J. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab* 2008;9:520-531.
64. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. New Delhi: Wolters Kluwer India Private Limited, 2011.
65. Giacomini K, Huang S, Tweedie D. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215-236.
66. Ho R, Kim R. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:260-277.
67. Chandra P, Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 2004;21:719-735.
68. Benet L. The drug transporter-metabolism alliance: uncovering and defining the inter- play. *Mol Pharm* 2009;6(6):1631-1643.



69. Nakanishi T, Tamai I. Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012;27:106-121.
70. Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Transporter-mediated drug-drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91(6):1053-1064.
71. Johnson T. The development of drug metabolizing enzymes and their influence on the susceptibility to adverse drug reactions in children. *Toxicology* 2003;192:37-48.
72. Soars M, Webborn P, Riley R. Impact of hepatic uptake transporters on pharmacokinetics and drug-drug interactions: use of assays and models for decision making in the pharmaceutical industry. *Mol Pharm* 2009;6:1662-1677.
73. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 5th ed. New York NY. Mc Graw Hill. 2005.
74. Kearns G, Abdel-Rahman S, Alander S. Developmental pharmacology: drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349:1157-1167.
75. Alcorn J, McNamara P. Using ontogeny information to build predictive models for drug elimination. *Drug Discov Today* 2008;13:507-512.
76. Ginsberg G, Hattis D, Sonawanec B. Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:164-183.
77. Johnson T, Rostami-Hodjegan A, Tucker G. Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(9):931-956.
78. Barter Z, Bayliss M, Beaune P. Scaling factors for the extrapolation of *in vivo* metabolic drug clearance from in vitro data: reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Curr Drug Metab* 2007;8:33-45.
79. Rostami-Hodjegan A, Tucker G. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:140-148.
80. de Wildt S, Ito S, Koren G. Challenges for drug studies in children: CYP3A phenotyping as example. *Drug Discov Today* 2009;14:6-15.



81. Stevens J, Hines R, Gu C. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:573-582.
82. Treluyer J, Bowers G, Cazali N. Oxidative metabolism of amprenavir in the human liver, effect of the CYP3A maturation. *Drug Metab Dispos* 2003;31:275-281.
83. Anderson G, Lynn A. Optimizing pediatric dosing: a developmental pharmacologic approach. *Pharmacotherapy* 2009;29:680-690.
84. Hines R, Koukouritaki S, Poch M. Identification and functional analysis of human FMO3 genetic variants. *FASEB J* 2006;20:A264-A264.
85. McCarver D, Hines R. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300(2):361-366.
86. McNamara P, Alcorn J. Protein binding predictions in infants. *Pharm Sci* 2002;4:E4.
87. Coleman M, Tingle M, Winn M. Gonadal influence on the metabolism and hematological toxicity of dapsone in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:698-703.
88. Ng W, Uchida H, Ismail Z. Clozapine exposure and the impact of smoking and gender: a population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 2009;31:360-366.
89. Gunes A, Ozbey G, Vural E. Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics* 2009;10:769-778.
90. Anderson G. Gender differences in pharmacological response: epilepsy in women: the scientific basis for clinical management. *Int Rev Neurobiol* 2008;83:1-10.
91. Liu W, Kulkarni K, Hu M. Gender-dependent differences in uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase have implications in metabolism and clearance of xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013;9(12):1555-1569.
92. Nolin T, Naud J, Leblond F, Pichette V. Emerging evidence of the impact of kidney disease on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(6):898-903.
93. Tsunedomi R, Iizuka N, Hamamoto Y. Patterns of expression of cytochrome P450 genes in progression of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2005;27:661-667.



94. Bogdanos D, Dalekos G. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem* 2008;15:2285-2292.
95. Villeneuve J, Pichette V. Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab* 2004;5:273-282.
96. Lu Y, Arthur I, Cederbaum A. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 2008;44:723-738.
97. Dietrich C, Geier A. Effect of drug transporter pharmacogenetics on cholestasis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10(11):1533-1551.
98. Taur S, Kulkarni N, Gandhe P, Thelma B, Ravat S, Gogtay N, Thatte U. Association of polymorphisms of CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1, and activity of P-glycoprotein with response to anti-epileptic drugs. *J Postgrad Med* 2014;60(3):265-269.
99. Kimura M, Yamagishi Y, Kawasumi N, Hagihara M, Hasegawa T, Mikamo H. Clinical implication of therapeutic drug monitoring on voriconazole from the aspect of the analysis for CYP2C19 gene. *Jpn J Antibiot* 2010;63(3):255-264.
100. Xie H, Kim R, Wood A. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:815-850.
101. Zandvliet A, Huitema A, Copalu W, Yamada Y, Tamura T, Beijnen J, Schellens J. CYP2C9 and CYP2C19 polymorphic forms are related to increased indisulam exposure and higher risk of severe hematologic toxicity. *Clin Cancer Res* 2007;13(10):2970-2976.
102. Sharer J, Shipley L, Vandenbranden M. Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* 1995;23(11):1231-1241.
103. LeCluyse E, Alexandre E, Hamilton G. Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 2005;290:207-229.
104. Tang W, Wang R, Lu A. Utility of recombinant cytochrome P450 enzymes: a drug metabolism perspective. *Curr Drug Metab* 2005;6(5):503-517.
105. Carlson T, Fisher M. Recent advances in high throughput screening for ADME properties. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008;11(3):258-264.



106. Bourcier K, Hyland R, Kempshall S. Investigation into UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme kinetics of imidazole- and triazole-containing antifungal drugs in human liver microsomes and recombinant UGT enzymes. *Drug Metab Dispos* 2010;38(6):923-929.
107. Yanni S, Chism J, Rickert D, Serabjit-Singh C. Diminished drug metabolism due to hormonal effects of cobalt mesoporphyrin on flavoproteins. *Chem Biol Interact* 1993;89(1):73-87.
108. Obach R. Predicting clearance in humans from in vitro data. *Curr Top Med Chem* 2011;11(4):334-339.
109. Gomez-Lechon M, Lahoz A, Gombau L. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des* 2010;16(17):1963-1977.
110. Sinz M, Kim S. Stem cells immortalized cells, and primary cells in ADMET assays. *Drug Discov Today Technol* 2006;3(1):79-85.
111. Guo L, Dial S, Shi L, et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2011;39(3):528-538.
112. Mao J, Mohutsky M, Harrelson JP, et al. Prediction of CYP3A mediated drug-drug interactions using human hepatocytes suspended in human plasma. *Drug Metab Dispos* 2011;39(4):591-602.
113. Foster J, Houston J, Halifax D. Comparison of intrinsic clearances in human liver microsomes and suspended hepatocytes from the same donor livers: clearance-dependent relationship and implications for prediction of in vivo clearance. *Xenobiotica* 2011;41(2):124-136.
114. Chu V, Einolf H, Evers R. In vitro and in vivo induction of cytochrome P450: a survey of the current practices and recommendations: a pharmaceutical research and manufacturers of America perspective. *Drug Metab Dispos* 2009;37(7):1339-1354.
115. Wang WW, Khetani S, Krzyzewski S. Assessment of a micropatterned hepatocyte coculture system to generate major human excretory and circulating drug metabolites. *Drug Metab Dispos* 2010;38(10):1900-1905.
116. Landskroner K, Hess P, Treiber A. Surgical and pharmacological animal models used in drug metabolism and pharmacokinetics. *Xenobiotica* 2011;41(8):687-700.



117. Penner N, Klunk L, Prakash C. Human radiolabeled mass balance studies: objectives, utilities and limitations. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30(4):185-203.
118. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Guidance for Industry. Safety testing of drug metabolites. FDA, 2008.
119. Bessire A, Youdim K, Hurst S, Lee A. Utility of genetically modified animal models for drug metabolism and drug transporters Part VI. Methods and protocols for prediction and evaluation of drug metabolism and drug interaction studies. In: *Encyclopedia of drug metabolism and interactions*, ed. Lyubimov AV. Hoboken, NJ: Wiley, 2012, 6:1-88.
120. Chen C, Stock J, Liu X, Shi J, Van Deusen J, DiMattia D, Dullea R, de Morais S. Utility of a novel Oatp1b2 knockout mouse model for evaluating the role of Oatp1b2 in the hepatic uptake of model compounds. *Drug Metab Dispos* 2008;36(9):1840-1845.
121. Katoh M, Tateno C, Yoshizato K. Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology* 2008;246(1):9-17.
122. Kamimura H, Nakada N, Suzuki K. Assessment of chimeric mice with humanized liver as a tool for predicting circulating human metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;25(3):223-235.
123. Okumura H, Katoh M, Sawada T, Nakajima M, Soeno Y, Yabuuchi H, Ikeda T, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Humanization of excretory pathway in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol Sci* 2007;97:533-538.
124. Xu X, Hirayama H, Pang K. First-pass metabolism of salicylamide. Studies in the once-through vascularly perfused rat intestine-liver preparation. *Drug Metab Dispos* 1989;17(5):556-563.



Capítulo 4

Excreción de fármacos

4.1 ¿Qué es la excreción de fármacos?

El organismo ha desarrollado mecanismos para eliminar residuos metabólicos y protegerse de compuestos químicos extraños, conocidos comúnmente como xenobióticos, mismos que se introducen al cuerpo desde su entorno y que, en muchas ocasiones, no tienen un rol fisiológico definido. Un grupo de compuestos que sí cuentan con un rol fisiológico definido y aun así se clasifican como xenobióticos son los fármacos. De no existir mecanismos que eliminaran a los xenobióticos del organismo, estas sustancias, una vez absorbidas, permanecerían tanto tiempo como lo permitiera su estabilidad química, con resultados difíciles de predecir y, muy seguramente, no positivos para la vida¹.

En términos muy simples, el proceso de excreción de un fármaco consiste en su salida del organismo a partir de algún proceso mediado por la función predominantemente del riñón o del hígado (aunque no son los únicos órganos secretores). Esta salida contribuye a la depuración sistémica del compuesto. Este proceso regula las concentraciones del fármaco en el organismo y, por ende, desempeña un papel fundamental en la seguridad y eficacia de los fármacos.

4.2 ¿Por qué es necesario estudiar la excreción de los fármacos?

Un concepto importante a introducir en este nivel del texto es el de aclaramiento o depuración. El aclaramiento (Cl) indica la capacidad del organismo o de un órgano en particular para eliminar un fármaco de la circulación sanguínea. Expresa el volumen de plasma (o un determinado fluido biológico) que ese órgano o el organismo es capaz de "limpiar" por unidad de tiempo. Cl es un indicador del volumen aparente de fluido que está siendo aclarado por unidad de tiempo.



Matemáticamente, el aclaramiento puede considerarse como la relación entre la velocidad de eliminación del fármaco y la concentración plasmática. Al ser la eliminación del fármaco comúnmente un proceso de primer orden, el aclaramiento tiene la particularidad de ser constante. El aclaramiento total o depuración sistémica, puede expresarse de conformidad con la Ecuación 4.1:

$$Cl_s = \frac{D_{iv}}{AUC_{0 \rightarrow \infty iv}} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

D_{iv} = Dosis administrada por vía intravenosa.

$AUC_{0 \rightarrow \infty iv}$ = Área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo al tiempo infinito tras la administración intravenosa.

El aclaramiento sistémico es el resultado del aclaramiento obtenido en varios órganos, es decir, es la suma del aclaramiento del fármaco en tales órganos al mismo tiempo. Para comprender el resultado total de la depuración del fármaco en el organismo, resulta entonces necesario estudiar los diferentes mecanismos de eliminación por cada órgano, mismos que a su vez podrán componerse de los procesos de biotransformación (ya estudiados en el capítulo anterior) y de eliminación.

Hay ciertos factores que determinan la vía de eliminación del fármaco a la excreción biliar o renal, como el peso molecular del fármaco, su polaridad y su metabolismo. Se ha encontrado que el corte de peso molecular de los fármacos eliminados en humanos por excreción biliar se encuentra en el rango de 500–600 Da y es fuertemente polar; sin embargo, en ratas, cobayos y conejos, los valores de corte de peso molecular son aproximadamente 325, 400 y 475 Da, respectivamente. La excreción biliar puede ser la ruta para la mayoría de las formas conjugadas, pero los fármacos no conjugados se pueden excretar predominantemente en la bilis.



Aunque estos factores están involucrados en la determinación de la ruta de eliminación, una observación definitiva indica que la captación y excreción de fármacos en el hígado y el riñón está determinada en gran medida por los transportadores según la selectividad del fármaco y los metabolitos. Además, se ha observado que la excreción biliar de antibióticos β -lactámicos por la proteína de resistencia a múltiples fármacos MRP2 aumenta con el aumento del peso molecular de esos fármacos. Sin embargo, el peso molecular, la lipofilicidad y el metabolismo de los fármacos no son los únicos determinantes de las vías de eliminación. Es, más bien, la captación y excreción de fármacos por los transportadores en el hígado y el riñón que median en gran medida las vías y mecanismos de eliminación²⁻⁷.

Como ya se discutió anteriormente, las proteínas del transporte son actores clave en la absorción, distribución y metabolismo de los fármacos orales. Para la excreción, que es el tema central de este capítulo, el transporte de fármacos y metabolitos se lleva a cabo también mediante los SLC y las proteínas ABC. Varios de los transportadores de SLC de captación, por ejemplo, los OAT, son sustratos bidireccionales y de transporte en ambas direcciones, como se muestra en la Figura 4.1.

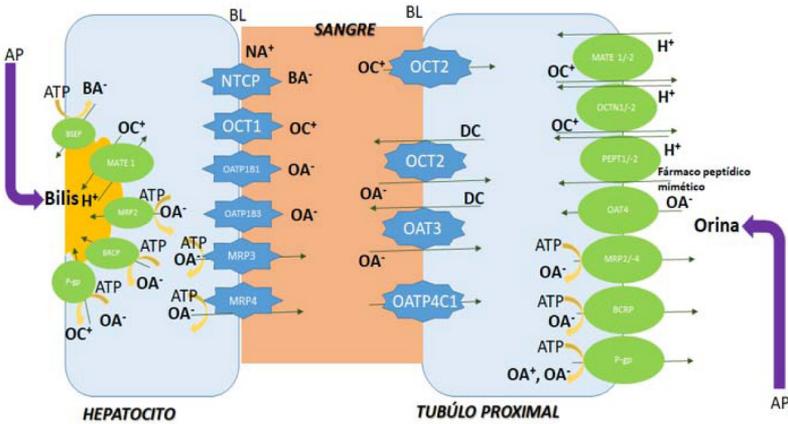


Figura 4.1 Transportadores de fármacos en la región apical (AP) y basolateral (BL) de los hepatocitos y las células tubulares proximales. OA⁻ Anión Orgánico, OC⁺ Cation Orgánico, BA⁻ Ácido Biliar.



4.3 ¿Qué factores afectan la excreción de fármacos?

4.3.1 Excreción biliar

Una de las funciones clave del hígado es la producción de bilis, misma que se forma en los hepatocitos a razón de ~ 1 litro/día. La bilis se recolecta en los canaliculos biliares, donde fluye en razón de 1.5 a 2 ml/min/kg hacia los conductos biliares, donde se dirige hacia el duodeno para coadyuvar en la digestión o desemboca en la vesícula biliar para su almacenamiento. La mayoría de las sales biliares en el intestino se reabsorben en el íleon terminal y regresan al hígado a través de la vena porta, donde los hepatocitos la reutilizan. Los transportadores que son específicos para el transporte de ácidos biliares (BA), conjugados y otros biomarcadores endógenos como la bilirrubina, se expresan en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y los canaliculos biliares apicales (Figura 4.2). Estos transportadores son capaces de captar y secretar fármacos y sus metabolitos⁸⁻¹².

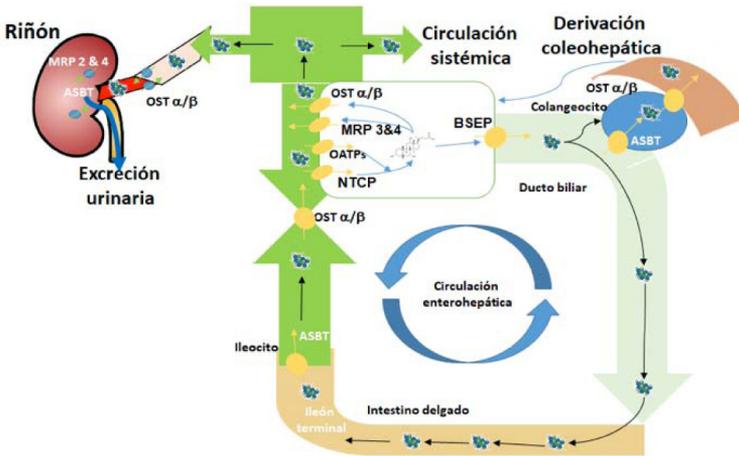


Figura 4.2 Roles de los transportadores de ácidos biliares en la recirculación enterohepática y la salida sistémica.



Una vez que los transportadores de membrana sinusoidal (BL) absorben un fármaco o metabolitos (generados en el tracto gastrointestinal [GI]) hacia el hepatocito, que se irriga a través de la circulación de la vena porta, existen dos vías que puede seguir¹³⁻¹⁵:

- 1) Puede ser secretado nuevamente a la circulación sistémica a través de transportadores de flujo sinusoidal, o
- 2) excretado como fármaco sin cambios o como metabolito en la bilis a través de los transportadores de flujo canalicular apical.

Los fármacos y los metabolitos excretados en la sangre sinusoidal a través de la membrana sinusoidal basolateral (BL) generalmente son eliminados en la orina, mientras que los que se excretan en la bilis a través de la membrana canalicular terminan en el intestino, donde se eliminan en las heces o pueden ser sometidos a reabsorción a través de un proceso conocido como recirculación enterohepática, como se indica en la Figura 4.2. En la excreción a través de la vía hepatobiliar, tanto el fármaco principal como los metabolitos deben ser ingresados en el hepatocito por proteínas transportadoras como OAT, OATP, OCT y NTCP.

Los transportadores que participan en la excreción biliar del hepatocito a la sangre biliar o sinusoidal incluyen BCRP, BSEP, P-gp, varios de los MRP y MATE1. Se ha demostrado que varios fármacos inhiben la BSEP (Ciclosporina A, bosentan, fluvastatina, glibenclamida, troglitazona y rifampicina), lo que podría conducir a colestasis. Los metabolitos, como los conjugados hidrofílicos, no pueden difundirse de manera pasiva fuera de los hepatocitos y, por lo tanto, deben ser transportados activamente. Las principales proteínas transportadoras involucradas en la excreción biliar y BL de los metabolitos de glucurónido, sulfato y glutatión (GSH) son los transportadores canaliculares de flujo de salida, MRP2 y BCRP, o los transportadores de flujo de salida de membrana sinusoidal, MRP3 y MRP4. La mayoría de los conjugados de glucurónido que se excretan en la bilis son sustratos MRP2 (por ejemplo, conjugados de ceftriaxona, ampicilina), mientras que la mayoría de los conjugados de sulfato son sustratos BCRP.



Los transportadores mediados por ATP responsables de la excreción de BL en la sangre sinusoidal son MRP3, MRP4, MRP5 y MRP6. De estos, MRP3 es eficiente en el transporte de conjugados tanto de glucurónido como de sulfato. MRP3 es responsable del transporte de metabolitos como la morfina-3-glucurónido y la morfina-6-glucurónido, mientras que se ha demostrado que MRP4 tiene una alta afinidad por los conjugados de sulfato, pero también es capaz de transportar los conjugados de glucurónido y GSH. Los conjugados de GSH también son transportados por MRP5 y MRP6. Sin embargo, poco se sabe de MRP5 y MRP6 en su capacidad para transportar aniones orgánicos conjugados. Los MRP también pueden transportar metabolitos no conjugados y moléculas de fármacos, como la micafungina⁸⁻¹⁵.

Cuando se deteriora la función hepática, se compromete la depuración hepática de la mayoría de los fármacos que se eliminan a través de la vía metabólica, lo que lleva a la acumulación y toxicidad del fármaco. El ajuste de la dosis de los fármacos excretados en la bilis humana se considera cuando se utiliza para tratar la función hepática alterada, y normalmente se requiere una reducción de la dosis. Fármacos como antibióticos como ampicilina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, troglitazona y cefazolina; otros agentes terapéuticos, tales como agentes antineoplásicos e inmunosupresores, u otros fármacos como la morfina fenitoína, sulfametoxazol testosterona, diazepam, digoxina y ácido valproico deben ser controlados¹⁶⁻¹⁸.

Además de la disminución del metabolismo derivado, la insuficiencia hepática y la colestasis potencial pueden ocurrir debido a la función alterada de los transportadores de fármacos que son responsables de excretar xenobióticos y moléculas endógenas, así como sus metabolitos. La mutación o inhibición de estos transportadores puede causar reacciones adversas graves a los fármacos, según lo informado por los esfuerzos del equipo del Consorcio Internacional. Además, se ha publicado una descripción general reciente de los posibles factores de susceptibilidad en la lesión hepática inducida por agentes antitiroideos. La edad, el género, las características del metabolismo, el consumo de alcohol, las enfermedades subyacentes, los mecanismos inmunológicos y las interacciones farmacológicas están implicados en el incremento del daño hepático inducido por fármacos antitiroideos. También se discuten los tratamientos utilizados clínicamente para la hepatotoxicidad inducida por fármacos antitiroideos y las posibles estrategias terapéuticas que se consideran efectivas contra esta complicación¹⁶⁻²⁰.



4.3.2 Excreción renal

La principal vía de excreción de fármacos es la que aprovecha las funciones renales. Hay tres mecanismos principales de excreción renal, mismos que son específicamente responsables de la excreción de fármacos, mismas que son utilizadas en función de las propiedades y estructuras del fármaco. Estos mecanismos son los que se esquematizan en la Figura 4.3:

- 1) filtración glomerular (FG),
- 2) secreción tubular (ST), y
- 3) reabsorción tubular (RA).

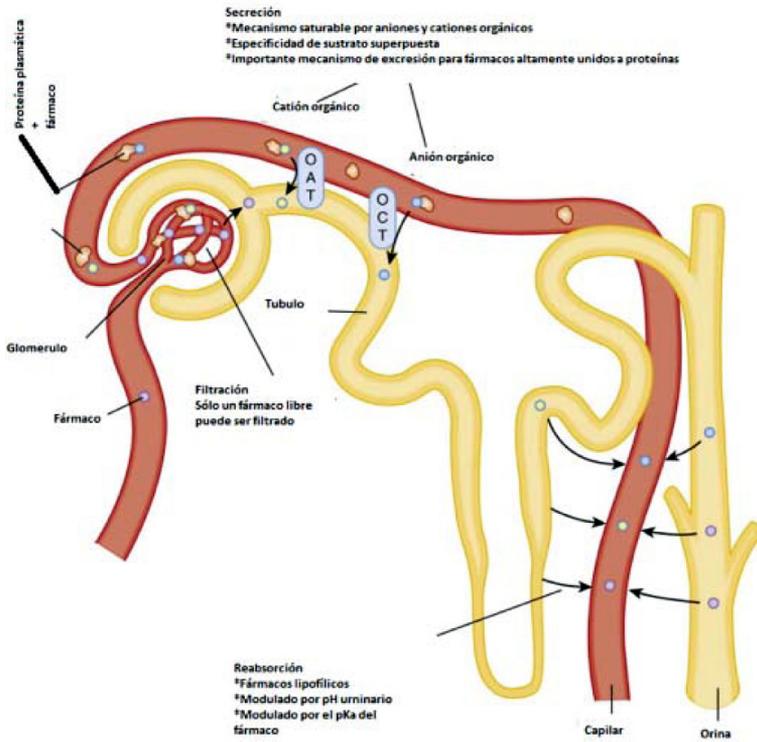


Figura 4.3 Mecanismos de excreción renal.



Los mecanismos de excreción renal son totalmente dependientes de la unidad funcional del riñón, la nefrona. La nefrona consta de varios componentes, que incluyen: 1) la cápsula de Bowman, 2) el túbulo proximal, 3) el asa de Henle, 4) el túbulo distal y 5) el conducto colector. Como ya se mencionó, el mecanismo de excreción renal que se emplee es dependiente de las propiedades del fármaco, por ejemplo, cuando las moléculas de bajo peso molecular se eliminan por vía renal, se filtran en la cápsula de Bowman. Por otra parte, cuando los fármacos son electrolitos débiles, como los ácidos, éstos se secretan y reabsorben activamente en los túbulos proximales. Por otra parte, la reabsorción de agua ocurre en el asa de Henle y la reabsorción pasiva de agua y de los fármacos solubles en lípidos ocurre en el túbulo distal²¹⁻²².

Con relación a la FG, los riñones reciben aproximadamente el 20% del gasto cardíaco, y la excreción se lleva a cabo en el compartimento glomerular al filtrar las moléculas de la sangre arterial, considerando que solo pueden pasar moléculas con pesos menores a 5kDa a través de las membranas de los glomérulos. En consecuencia, los fármacos unidos a proteínas, o aquellos que se incorporan a los glóbulos rojos, no se filtran a través de los glomérulos.

Se sabe que el 10% de la sangre que entra en el glomérulo se filtra. La inulina se filtra fácilmente en el glomérulo y no está sujeta a secreción o reabsorción tubular, por lo que su secreción es medida indirecta de la FG. En individuos sanos, el intervalo normal es de 110 a 130 ml/min (≈ 180 L de sangre filtrada/día)²³⁻²⁴. La depuración renal de fármacos (CLr) se estima mediante la ecuación 4.2:

$$Clr = \frac{Rr}{Cp} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde Rr es la tasa de excreción renal y Cp es la concentración plasmática.

Cuando no intervienen otros factores, como la unión a proteínas o la secreción/reabsorción, la depuración renal del fármaco será equivalente a la velocidad de filtración glomerular (GFR, Glomerular Filtration Rate en inglés). Aunque la mayoría de los fármacos se filtran de la sangre en el glomérulo, la excreción renal total está controlada por lo que sucede en los túbulos. Más del 90% del filtrado es reabsorbido²³⁻²⁴.



En lo que respecta a la ST, en el túbulo proximal se produce una secreción activa de moléculas, que requiere un transportador y un suministro de energía. Esta puede ser una vía importante para la excreción de algunos compuestos, tales como la penicilina, la metformina y la cimetidina. Debido a que la secreción tubular es un proceso activo, puede haber una inhibición competitiva de la secreción de un compuesto por otro, como se observa en la inhibición de la excreción de penicilina por competencia con probenecid, lo que reduce la eliminación de la penicilina, prolongando así las concentraciones plasmáticas de penicilina. Esto también podría usarse para reducir la excreción de cefalosporinas. Los fármacos o compuestos que se secretan extensamente, como el ácido p-aminohipúrico (HAP), pueden tener valores de depuración que se aproximan al flujo plasmático renal de 425 a 650 ml / min y se utilizan clínicamente para medir este parámetro fisiológico²²⁻²⁴.

Los fármacos presentes en el filtrado glomerular pueden reabsorberse en el túbulo distal, donde hay excreción pasiva y reabsorción extensa de fármacos solubles en lípidos que impregnan fácilmente la membrana celular. El agua en el filtrado se reabsorbe y, por lo tanto, el gradiente de concentración se encuentra ahora en la dirección de reabsorción. Por lo tanto, si un fármaco no está ionizado o en forma no ionizada, se puede reabsorber fácilmente.

El pH del filtrado puede influir enormemente en la magnitud de la reabsorción tubular para muchos fármacos que son ácidos o bases débiles. Cuando la orina es ácida, los fármacos ácidos débiles tienden a reabsorberse, mientras que cuando la orina es más alcalina, las bases débiles se reabsorben más extensamente. Por lo tanto, la orina ácida puede causar menos reabsorción de bases débiles o excreción mejorada y viceversa para la orina básica. Estos cambios pueden ser bastante significativos, ya que el pH de la orina puede variar de 4.5 a 8.0 por las variaciones en la dieta (por ejemplo, la carne reduce el pH de la orina) o como un efecto de fármacos específicos. En el caso de una sobredosis de fármacos, es posible aumentar la excreción de algunos fármacos mediante un ajuste adecuado del pH de la orina. Por ejemplo, en una sobredosis de barbitúricos (ácidos débiles), puede ser posible aumentar su excreción al disminuir su reabsorción con infusiones de bicarbonato de sodio, lo que hace que la orina sea más alcalina.



El proceso de reabsorción de glucosa y componentes de filtrado solubles en lípidos ocurre a lo largo de los túbulos proximal, distal y colector, terminando nuevamente en el plasma con solo 1 - 2 ml/min del volumen de filtrado total (filtrado por los glomérulos) eliminado en la orina. Como se explicó anteriormente, el pH del fluido tubular (que generalmente varía de 4.5 a 8) puede determinar si ciertos fármacos se excretan en la orina o se reabsorben. Las moléculas no iónicas no cargadas pueden difundirse pasivamente a través de la membrana celular. Sin embargo, los fármacos iónicos se segregan contra un gradiente de concentración, por lo que el proceso es un transporte activo que media los transportadores de fármacos, como el antibiótico β -lactámico dicloxacilina, que son reabsorbidos por los túbulos proximales a través del transporte activo. Un segundo mecanismo de reabsorción en el riñón es la endocitosis. La endocitosis en el riñón se produce por la formación de vesículas a lo largo de la membrana del borde en cepillo, que puede absorber líquidos y compuestos²⁴⁻²⁵.

Al igual que en los hepatocitos, el sitio primario de transporte de fármacos y metabolitos de la sangre a la orina son las células de los túbulos proximales. Los transportadores de flujo de salida en el riñón están ubicados en la membrana de borde en cepillo apical (AP, luminal) y pueden transportar un fármaco sin cambios o sus metabolitos desde las células tubulares proximales a la orina (Figura 4.1).

La captación de fármacos está mediada por varias familias de transportadores como OAT y OCT en la membrana BL de las células de los túbulos proximales. También hay transportadores bidireccionales OAT4, URAT1 y PEPT1/2, que transportan sustratos endógenos y posiblemente fármacos desde la orina de regreso al PTC. El PEPT2, por ejemplo, está involucrado en la reabsorción de fármacos similares a los péptidos, mientras que los transportadores bidireccionales URAT1 y OAT4 hasta el momento solo han demostrado estar involucrados en la reabsorción de sustratos endógenos como el urato²⁶⁻²⁷.



Hay otros transportadores en la familia OAT, como OAT4, que también se expresan en el riñón humano, pero su función significativa en la eliminación y eliminación de fármacos en humanos aún es desconocida. Tanto OAT1 como OAT3 median el transporte activo y la bencilpenicilina es un inhibidor relativamente específico de ellos. Al comparar la potencia de inhibición, los resultados sugieren que tanto OAT1 como OAT3 contribuyen a la absorción renal de aniones orgánicos. OAT1 contribuye a la captación de aniones orgánicos de bajo peso molecular, como p-aminohipurato y fármacos antivirales (adefovir, cidofovir y tenofovir), mientras que OAT3 contribuye más a la captación renal de aniones orgánicos anfipáticos voluminosos, como estatinas, sartanes, y la bencilpenicilina, que también son sustratos de transportadores de aniones orgánicos hepático. Además, OAT3 acepta algunos fármacos catiónicos, como los antagonistas del receptor H2, y los zwitteriones como la fexofenadina²⁶⁻²⁷.

Para el sistema de transporte de catión orgánico, OCT2 es el transportador de catión orgánico predominante en la membrana BL. OCT2 media la difusión facilitada de varios fármacos catiónicos, incluyendo metformina y cimetidina. Se supone que el mecanismo de flujo luminal (AP) para cationes hidrófilos u orgánicos se activa según el gradiente de concentración externo de protones, que puede aumentar la captación de compuestos catiónicos típicos en las vesículas de membrana de borde en cepillo. También se han identificado proteínas MATE, que comprenden MATE1 y MATE2K en el riñón humano, que aceptan cationes orgánicos, y se consideran responsables del antitransporte de los cationes orgánicos con protones en el riñón.

Se ha demostrado que los transportadores ABC que median en el transporte activo primario, como BCRP, MRP2 y MRP4, constituyen un tercer mecanismo de flujo de salida en el riñón. La falta de ese transportador no afectará la depuración tubular con respecto a las concentraciones plasmáticas, sino que aumentará significativamente la concentración renal de fármacos como triclorotiazida, cefalosporinas (ceftizoxim y cefazolin) y antivirales (adefovir y tenofovir) cuando estén se administra por vía intravenosa mediante infusión constante. Además de MRP4, los sujetos con un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) o mutación en MRP2 mostraron una eliminación retardada de metotrexato a través de la eliminación sistémica, lo que sugiere la participación de MRP2 en el flujo luminal. Al igual que en la excreción hepatobiliar, MRP2 participa principalmente en la excreción renal de glucurónido, sulfato y conjugados de GSH²⁵⁻³⁰.



Al igual que en la insuficiencia hepática, la insuficiencia renal ha llevado a modificar los regímenes de dosificación para pacientes ancianos con función renal comprometida y ha dado como resultado pautas de la FDA sobre cuándo y cómo realizar estudios de insuficiencia renal. La enfermedad renal puede afectar a los transportadores y enzimas metabólicas en el hígado y el tracto gastrointestinal, potencialmente debido a la acumulación de toxinas urémicas. Actualmente, se postula que las toxinas urémicas como la urea, la hormona paratiroidea, el indoxil sulfato y las citoquinas pueden causar modificaciones transcripcionales/traduccionales o la inhibición de enzimas metabolizadoras y transportadores. Se sabe que la enfermedad renal altera la depuración renal (es decir, la FG). La observación es que la enfermedad renal también produce alteraciones en la depuración no renal (CINR), y es posible que las dosis habituales de los fármacos metabolizados deban modificarse para individualizar el tratamiento para los pacientes con insuficiencia renal³¹⁻³⁵.

4.4 Métodos para la determinación de la excreción de fármacos

4.4.1 Métodos *in vitro* en la determinación de la depuración biliar

Se han establecido muchas herramientas *in vitro* e *in situ*, así como modelos animales, para estudiar los procesos implicados en el metabolismo y la disposición hepatobiliar de los fármacos. A pesar de la disponibilidad de modelos *in vitro* para estimar la depuración biliar (Cl_{biliar}) de los compuestos *in vivo*, existe poca información sobre la precisión predictiva de estos métodos en humanos debido a la ausencia de estudios clínicos sistemáticos que midan el Cl_{biliar} de los fármacos³⁶⁻³⁷.

La excreción biliar de fármacos se puede investigar utilizando sistemas *in vitro* con diversos grados de complejidad, desde un modelo simple como el hepatocito fresco aislado primario, hasta vesículas de membrana sinusoidal o canalicular preparadas a partir de una línea celular transfectada con proteínas transportadoras específicas. Los hepatocitos humanos expresan la gama completa de enzimas metabolizantes y proteínas de transporte, y los hepatocitos humanos cultivados en sándwich (SCHH) se repolarizan, forman redes canaliculares, expresan y localizan adecuadamente proteínas de transporte de fármacos relevantes y funcionales, y se pueden usar para caracterizar la captación y el flujo de salida de xenobióticos por el hígado (Figura 4.4)³⁷⁻⁴⁰.





Figura 4.4 Hepatocitos cultivados en sándwich, un modelo *in vitro* para la disposición hepatobiliar.

Para garantizar la utilidad de SCHH como modelo predictivo de la depuración biliar en seres humanos, es esencial que el sistema *in vitro* mantenga la expresión y función de las proteínas de transporte de fármacos hepáticos de manera similar a la situación *in vivo*. Cuando se cultivan en una configuración de sándwich, los hepatocitos humanos primarios se repolarizan con el tiempo y forman canalículos biliares; sin embargo, el grado de formación de la red canalicular biliar varía de un donante a otro y no es tan extenso como el observado en el tejido nativo. Si los canalículos biliares ocupan menos área de superficie por hepatocito, es probable que se excreta menos fármaco a la bilis en hepatocitos cultivados en sándwich en comparación con *in vivo*⁴⁰⁻⁴².

4.4.2 Métodos *in vitro* en la determinación de la depuración renal

Debido a la falta de disponibilidad de un modelo experimental adecuado que aborde todos los problemas relacionados con la eliminación renal y los mecanismos, así como la toxicidad, se han logrado discretos avances en la secreción renal de xenobióticos. En la Tabla 4.1, se enumeran algunos modelos que se usaron para probar aplicaciones específicas⁴³⁻⁴⁶.



Tabla 4.1 Lista de modelos establecidos utilizados *in vitro* para determinar la excreción renal, sus mecanismos y la nefrotoxicidad.

Modelo	Aplicación
Riñón perfundido aislado	Estudio de la función renal y del proceso de transporte de fármacos
Cortes de riñón	Transporte activo de aniones orgánicos y funciones metabólicas utilizadas como modelos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>
Suspensión de células aisladas	Estudios de nefrotoxicidad, captación y metabolismo
Células tubulares proximales cultivadas	Mecanismos de transporte y de disposición renal

4.4.3 Métodos *in vivo* en la determinación de depuración biliar y renal

El estudio más común y bien realizado para evaluar la eliminación renal, similar al caso de la eliminación biliar, es mediante el uso de un fármaco radiomarcado en un estudio de balance de masas (MBS), que generalmente se realiza en un modelo animal *in vivo*. También se lleva a cabo en la investigación clínica de Fase 1 en humanos para monitorear la vía de eliminación de los fármacos y metabolitos del fármaco precursor⁴⁷⁻⁵¹.

La forma más completa de cuantificar la eliminación de fármacos y metabolitos en las heces y la orina es a través de un MBS humano. En los MBS, el fármaco radiomarcado (generalmente ¹⁴C) se dosifica a través de la vía de administración terapéutica (oral o IV). La posición de la radiomarcación en el compuesto se elige de modo que sea metabólicamente estable a las posibles vías de biotransformación. Las muestras, como la orina y las heces (así como el plasma), se recolectan, y la cantidad de radioactividad en las muestras se cuantifica utilizando una variedad de técnicas analíticas. Para medir la depuración renal y biliar en estos estudios, se emplean las Ecuaciones 4.3 y 4.4, respectivamente⁴⁹⁻⁵²:

$$Cl_r = \frac{\text{Cantidad del fármaco excretada en orina al tiempo } = t}{ABC_{(0-t)iv}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$



$$Cl_b = \frac{\text{Cantidad del fármaco excretada en bilis al tiempo} = t}{ABC_{(0-t)iv}} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

En los seres humanos, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) exige que se incluya MBS en cada solicitud de fármaco nuevo (NDA, New Drug Application). El balance de masa completo (100% de recuperación de material radioactivo) rara vez se alcanza en humanos (y algunas veces en especies preclínicas) debido a problemas de muestreo o analíticos. Sin embargo, normalmente se pueden lograr recuperaciones de más del 80% en MBS humanos, y se ha recomendado una recuperación de no menos del 90% en estudios con animales como un límite mínimo para la aceptabilidad⁵¹⁻⁵⁴.

En un MBS humano, la fracción de la cantidad de fármaco que ingresa a la circulación sistémica que se excreta sin cambios en la orina (f_e) es un parámetro que indica si la vía principal de eliminación del fármaco inalterado es la excreción o la biotransformación. El valor de f_e varía entre 0.0 y 1.0 dependiendo de la magnitud en que un fármaco se excreta por vía renal en comparación con la eliminación general del fármaco (teóricamente 1.0). Cuando el valor es bajo, la excreción renal es una vía menor de eliminación del fármaco, lo que sugiere que la mayor cantidad del fármaco administrado se biotransforma. Las Ecuaciones 4.5 y 4.6 establecen la forma de calcular f_e , la primera para la administración intravascular, la segunda para la extravascular, ya que considera a F , la biodisponibilidad absoluta del fármaco:

$$f_e = \frac{U^\infty}{\text{Dosis}} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

$$f_e = \frac{U^\infty}{F * \text{Dosis}} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

La cantidad de fármaco inalterado (U) que se excreta en la orina se calcula multiplicando la concentración de fármaco en orina y el volumen de orina recolectado dentro de un intervalo de tiempo y sumando la cantidad de todos los intervalos, como se mostró anteriormente. En la práctica, la recolección de orina debe cuidarse durante al menos cinco vidas medias.



Un modelo de ratón quimérico, como se describe en el capítulo 3, es un modelo que se modifica genéticamente al reemplazar los hepatocitos nativos de ratón por hepatocitos de un donante humano. Los ratones inmunodeficientes que sobreexpresan el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y con un knockout de los genes de la fumarilacetoacetato hidrolasa (Fah) son los dos modelos de ratón más comunes para estos estudios. Estos ratones se denominan quiméricos o "humanizados" porque el hígado está repoblado en un 70 a 90% con células humanas. Actualmente se están llevando a cabo varias investigaciones para evaluar las fortalezas y debilidades del modelo de ratón humanizado hacia su uso completo como un modelo ADBE y de toxicidad que puede imitar la disposición y seguridad de los fármacos en humanos⁵⁵⁻⁵⁷.



4.5 Referencias

1. Talevi A, Quiroga P, Ruiz M. Procesos biofarmacéuticos. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata. 2016.
2. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:425-446.
3. Watanabe T. Prediction of the hepatic and renal clearance of transporter substrates in rats using in vitro uptake experiments. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1471-1479.
4. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res*;2009;26:2039-2054.
5. Levine WG. Biliary excretion of drugs and other xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1978;18:81-96.
6. Hrom PC, Millbum P, Smith RI. Species variations in the threshold molecular weight factor for the biliary excretion of organic anions. *Biochem J* 1972;129:1071-1077.
7. Kato Y, Takahara S, Kato S. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of β -lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos* 2008;36(6):1088-1096.
8. Giacomini KM, Huang S-W, Tweedie DJ. The International Transport Consortium. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev* 2010;9:215-236.
9. Kusters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease *Xenobiotica* 2008;38(7-8):1043-1071.
10. Chandra P, Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 2004;21(5):719-735.
11. Zamek-Gliszczyński MJ, Hoffmaster KA, Nezasa K-I. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:447-486.
12. Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Eur J Physiol* 2007;453:611-620.
13. Keppler D, König J. Expression and localization of the conjugate export pump encoded MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* 1997;11:509-516.



14. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:501-517.
15. Ghibellini G, Leslie EM, Brouwer, KLR. Methods to evaluate biliary excretion of drugs in humans: an updated review. *Mol Pharm* 2006;3:198-211.
16. Klotz U. Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 2007;46(12):985-986.
17. Zamek-Gliszczynski MJ, Lee CA, Poirier A, Bentz J, Chu X, Ellens H, Ishikawa T, Jamei M, Kalvass JC, Nagar S, Pang KS, Korzekwa K, Swaan PW, Taub ME, Zhao P, Galetin A; International Transporter Consortium. ITC recommendations for transporter kinetic parameter estimation and translational modeling of transport-mediated PK and DDIs in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94(1):64-79.
18. Oude Elferink RP, Paulusma CC, Groen AK. Hepatocanicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 2006;130(3):908-925.
19. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2006;44(4):778-787.
20. Heidari R, Niknahad H, Jamshidzadeh A, Abdoli N. Factors affecting drug-induced liver injury: antithyroid drugs as instances. *Clin Mol Hepatol* 2014;20(3):237-248.
21. Perri D, Ito S, Rowsell V. The kidney—the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *Can J Clin Pharmacol* 2003;10(1): 17-23.
22. El-Sheikh AA, Masereeuw R, Russel FG. Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* 2008;585:245-255.
23. Inui K-I, Masuda S, Saito H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* 2000;58:944-958.
24. Masereeuw R, Russel GM. Mechanisms and clinical implications of renal drug excretion. *Drug Metab Rev* 2001;33(3&4):299-351.
25. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008;35:572-579.
26. Tamai I, Nezu J, Uchino H. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:251-260.



27. Wright SH, Dantzer WH. Molecular and cellular physiology of renal cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004;84:987-1049.
28. Kamal MA, Keep RF, Smith DE. Role and relevance of PEP2 in drug disposition, dynamics, and toxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23:236-242.
29. Dekant W, Vamvakas S. Biotransformation and membrane transport in nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 1996;26:309-334.
30. Rau T, Erney B, Gores R, et al. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:468-476.
31. Olyaei AJ, Bennett WM. Drug dosing in the elderly patients with chronic kidney disease. *Clin Geriatr Med* 2009;25:459-527.
32. Huang SM, Temple R, Xiao S. When to conduct a renal impairment study during drug development: US food and drug administration perspective. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(5):475-479.
33. Nolin TD, Naud J, Leblond FA. Emerging evidence of the impact of kidney disease on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(6):898-903.
34. Hong Sun, Lynda Frassetto, Leslie Z. Benet Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* 2006;109(1-2):1-11.
35. Bellomo G. Uric acid and chronic kidney disease: A time to act? *World J Nephrol* 2013;2(2):17-25.
36. Obach RS, et al. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:46-58.
37. Sasaki M. Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2. *Mol Pharmacol* 2004;66:450-459.
38. Yanni SB, Augustijns PF, Benjamin DK Jr, Brouwer KL, Thakker DR, Annaert PP. In vitro investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metab Dispos* 2010;38(10):1848-1856.
39. Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, et al. Use of Ca²⁺ modulation to evaluate biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289: 1592-1599.



40. Abe K, Bridges AS, Yue W, et al. In vitro biliary clearance of angiotensin II receptor blockers and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in sandwich-cultured rat hepatocytes: comparison with in vivo biliary clearance. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:983-990.
41. Fukuda H, Ohashi R, Tsuda-Tsukimoto M, et al. Effect of plasma protein binding on in vitro-in vivo correlation of biliary excretion of drugs evaluated by sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2008;36:1275-1282.
42. Ghibellini G, Vasist LS, Leslie EM, Heizer WD, Kowalsky RJ, Calvo BF, Brouwer KL. In vitro-in vivo correlation of hepatobiliary drug clearance in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(3):406-413.
43. Wright SH, Dantzler WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004;84(3):987-1049.
44. Brown CD, Sayer R, Windass AS, Haslam IS, De Broe ME, D'Haese PC, Verhulst A. Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233(3):428-438.
45. Verhulst A, Sayer R, De Broe ME, D'Haese PC, Brown CD. Human proximal tubular epithelium actively secretes but does not retain rosuvastatin. *Mol Pharmacol* 2008;74(4):1084-1091.
46. Gianni S. Translational ADMET for drug therapy. Hoboken NJ. John Wiley & Sons. 2015.
47. Prakash C, Chen W, Rossulek M. Metabolism, pharmacokinetics, and excretion of a cholesteryl ester transfer protein inhibitor, torcetrapib, in rats, monkeys, and mice: characterization of unusual and novel metabolites by high resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance. *Drug Metab Dispos* 2008;36(10):2064-2079.
48. Prakash C, Kamel A, Anderson W. Metabolism and excretion of the novel antipsychotic drug ziprasidone in rats after oral administration of a mixture of ¹⁴C- and ³H- labeled ziprasidone. *Drug Metab Dispos* 1997;25(2):206-218.
49. Roffey SJ, Obach RS, Gedge JI. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data I animal and excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug Metab Rev* 2007;39:17-43.



50. Monro AM. Interspecies comparisons in toxicology: the utility and futility of plasma concentrations of the test substance. *Reg Toxicol Pharmacol* 1990;12:137-160.
51. Penner N, Klunk LJ, Prakash C. Human radiolabeled mass balance studies: objectives, utilities and limitations. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30:185-203.
52. Beumer JH, Beijnen JH, Schellens JHM. Mass balance studies, with a focus on anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(26):33-58.
53. Baillie TA, Cayen MN, Fouda H. Drug metabolites in safety testing. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;182:188-196.
54. Smith DA, Obach RS. Seeing through the MIST: abundance versus percentage. Commentary on metabolites in safety testing. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1409-1417.
55. Strom SC, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion and toxicity. *Methods Mol Biol* 2010;640:491-509.
56. Schulz-Utermoehl T, Sarda S, Foster JR, Jacobsen M, Kenna GJ, Morikawa Y, Salmu J, Gross G, Wilson ID. Evaluation of the pharmacokinetics, biotransformation and hepatic transporter effects of troglitazone in mice with humanized livers. *Xenobiotica* 2012;42(6):503-517.
57. Masakazu Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies. *Int J Mol Sci* 2014;15(1):58-74.



Abreviaturas





F	Biodisponibilidad absoluta
IV	Intravascular
AUC	Área Bajo la Curva (por sus siglas en inglés)
D_{po}	Dosis vía oral
D_{iv}	Dosis vía intravenosa
f_a	Fracción de la dosis que ha atravesado las barreras biológicas
F_{G'} F_{H'} F_P	Biodisponibilidades locales (gástrica, hepática y pulmonar)
ASP	Área superficial polar
TI	Transporte por influjo
TE	Transporte por eflujo
TF	Transportadores de fármacos
SLC	Acarreadores de soluto
OATP	Transportadores de Aniones Orgánicos
OCTN	Transportadores de Zwitteriones/Cationes Orgánicos
ABC	Transportadores ABC (ATP-Binding Cassete, por sus siglas en inglés)
FD	Farmacodinamia
FC	Farmacocinética
ADBE	Absorción, distribución, biotransformación y excreción
QWBA	Autorradiografía cuantitativa de todo el cuerpo
EBM	Estudio de balance de masa tradicional
EPT	Tomografía por emisión de positrones
V_d	Volumen de distribución
V_{d_{ee}}	Volumen de distribución en estado estacionario
PM	Peso molecular
BHE	Barrera hematoencefálica
SNC	Sistema nervioso central



LCR	Líquido cefalorraquídeo
HSA	Albúmina sérica humana
AGP	Glicoproteína α -1
f_u	Fracción no unida
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a masas-masas
MBS	Balance de masas
Ka	Constante de Absorción
Ke	Constante de Eliminación
IDD	Interacción Fármaco-Fármaco
EMF	Enzimas metabolizadoras de fármacos
REL	Retículo endoplásmico liso
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
MTR	Tiempo de residencia promedio
BFFC	modelos farmacocinéticos de base fisiológica
Da	Daltons



Introducción a los Procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de fármacos (ADBE) en las Ciencias Farmacéuticas

Vicente Jesús Hernández Abad
Elizabeth Guadalupe Sánchez González
Cynthia Espinosa Contreras



Esta obra es el resultado del conocimiento de los retos a los que nos hemos enfrentado, durante más de veinte años, los autores de este libro, para tratar de transmitir este conocimiento a los alumnos del último semestre de la Carrera de QFB de la FES Zaragoza.

Este libro pretende subsanar estas deficiencias y, estamos seguros, se logrará un conocimiento más sencillo y un dominio de los conceptos aquí vertidos.



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,
Campus I. Av. Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente,
Campus II. Batalla 5 de Mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto,
Col. Ejército de Oriente,
Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México.
Campus III. Ex fábrica de San Manuel s/n,
Col. San Manuel entre Corregidora y Camino a Zautla,
San Miguel Contla, Santa Cruz Tlaxcala.

<http://www.zaragoza.unam.mx>

